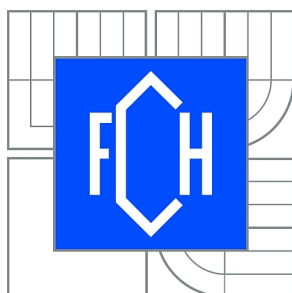




VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

DENNÍ CHOD AKTIVITY ENZYMU RUBISCO V PODMÍNKÁCH NORMÁLNÍ A ZVÝŠENÉ KONCENTRACE OXIDU UHLIČITÉHO

DIURNAL CHANGES OF RUBISCO ACTIVITY UNDER AMBIENT
AND ELEVATED CONCENTRATIONS OF CARBON DIOXIDE

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

LUCIE UHROVÁ

VEDOUcí PRÁCE

SUPERVISOR

PhDr. MIROSLAV HRSTKA, Ph.D.

BRNO 2010



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce:	FCH-BAK0490/2009	Akademický rok: 2009/2010
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka):	Lucie Uhrová	
Studijní program:	Chemie a technologie potravin (B2901)	
Studijní obor:	Potravinářská chemie (2901R021)	
Vedoucí práce	PhDr. Miroslav Hrstka, Ph.D.	
Konzultanti:		

Název bakalářské práce:

Denní chod aktivity enzymu Rubisco v podmínkách normální a zvýšené koncentrace oxidu uhličitého

Zadání bakalářské práce:

V teoretické části práce pojednat o základních procesech fotosyntézy, enzymu Rubisco, vlivu zvýšené koncentrace oxidu uhličitého na rostliny a o denním chodu aktivity Rubisco u různých druhů rostlin.

V experimentální části sledovat změny aktivity a aktivace enzymu Rubisco v průběhu dne u buku lesního v podmínkách normální a zvýšené koncentrace oxidu uhličitého. Z průběhu počáteční a celkové aktivity Rubisco odvodit mechanismus regulace aktivity tohoto enzymu.

Termín odevzdání bakalářské práce: 28.5.2010

Bakalářská práce se odevzdává ve třech exemplářích na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu bakalářské práce. Toto zadání je přílohou bakalářské práce.

Lucie Uhrová
Student(ka)

PhDr. Miroslav Hrstka, Ph.D.
Vedoucí práce

doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 1.12.2009

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

V této bakalářské práci byl studován denní chod aktivity enzymu Rubisco v podmínkách normální ($380 \mu\text{mol mol}^{-1}$) a zvýšené ($700 \mu\text{mol mol}^{-1}$) koncentrace oxidu uhličitého u buku lesního (*Fagus sylvatica*). Vzorky listů byly odebírány 22. 7. 2009 od 4:00 do 21:30 zhruba ve dvouhodinových intervalech, aktivita Rubisco byla stanovena spektrofotometricky. Mezi aktivitami enzymu Rubisco v listech rostoucích při normální a zvýšené koncentraci oxidu uhličitého nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly, nebyla tedy prokázána aklimační deprese aktivity Rubisco vlivem dlouhodobého působení zvýšené koncentrace CO_2 . Po rozednění nenastal vzestup celkové aktivity Rubisco, což svědčí o nepřítomnosti nebo zanedbatelné roli nočního inhibitoru CA1P. V průběhu dne vykazovala aktivita jenom statisticky nevýznamné odchylky. Mírný pokles stupně aktivace v odpoledních hodinách indikuje mírnou odpolední depresi počáteční aktivity enzymu Rubisco.

ABSTRACT

Diurnal changes of Rubisco activity under the impact of ambient ($380 \mu\text{mol mol}^{-1}$) and elevated ($700 \mu\text{mol mol}^{-1}$) concentrations of carbon dioxide were studied in beech (*Fagus sylvatica*). Samples from leaves were taken in the two-hour intervals from 4:00 to 21:30 on the 22. 7. 2009 and activity of Rubisco was determined spectrophotometrically. No statistically significant differences were found between Rubisco activity of leaves growing in ambient and elevated CO_2 concentrations. No increase of Rubisco total activity after daylight shows that nocturnal inhibitor CA1P is not present or plays only negligible role in beech. During the day Rubisco activity showed only statistically insignificant deviations. A slight decrease of Rubisco activation state in the afternoon indicates the afternoon depression of Rubisco initial activity.

KLÍČOVÁ SLOVA

buk lesní, aktivita enzymu Rubisco, normální a zvýšená koncentrace CO_2

KEY WORDS

beech, Rubisco activity, ambient and elevated CO_2 concentration

UHROVÁ, L. Denní chod aktivity enzymu Rubisco v podmínkách normální a zvýšené koncentrace oxidu uhličitého. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2010. 39 s. Vedoucí bakalářské práce PhDr. Miroslav Hrstka, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že bakalářská práce byla vypracována samostatně a že všechny použité literární zdroje byly správně a úplně citovány. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

Poděkování:

Ráda bych poděkovala vedoucímu bakalářské práce, panu PhDr. Miroslavu Hrstkovi, Ph.D. za velkou trpělivost, vstřícnost a cenné připomínky v průběhu psaní této práce.

OBSAH

1	Úvod.....	7
2	Teoretická část.....	8
2.1.	Fotosyntéza.....	8
2.1.1.	Fotosyntetický aparát	8
2.1.2.	Světelná fáze fotosyntézy	9
2.1.3.	Temnostní fáze fotosyntézy (Calvinův cyklus).....	11
2.2.	Rubisco.....	12
2.2.1.	Struktura enzymu Rubisco	13
2.3.	Vliv zvýšené koncentrace CO ₂ na rostliny	15
2.3.1.	Přímé účinky CO ₂ na rostliny.....	16
2.3.1.1.	Rychlost fotosyntézy	16
2.3.1.2.	Rychlost respirace.....	17
2.3.1.3.	Vodivost průduchů	17
2.3.1.4.	Rychlost dýchání	17
2.3.2.	Nepřímé účinky CO ₂ na rostliny	18
2.3.2.1.	Vliv teploty	18
2.3.2.2.	Příjem minerálních živin	18
2.3.2.3.	Vliv CO ₂ na spotřebu vody.....	19
2.4.	Rostliny C ₃ a C ₄	19
2.5.	Účinky zvýšené koncentrace CO ₂ na stromy	20
2.6.	Metody stanovení aktivity Rubisco	21
2.6.1.	Spektrofotometrické stanovení.....	21
2.6.2.	Radiometrické stanovení	21
2.6.3.	Gazometrické stanovení	21
3	Experimentální část.....	22
3.1.	Materiál	22
3.2.	Spektroskopické stanovení počáteční a celkové aktivity Rubisco	23
3.2.1.	Přístroje	23
3.2.2.	Chemikálie	23
3.2.3.	Příprava roztoků	24
3.2.3.1.	Příprava zásobního roztoku 50 mM HEPES-KOH, pH 7,8	24
3.2.3.2.	Příprava zásobního roztoku 50 mM HEPES-KOH, pH 8,0	24
3.2.3.3.	Příprava aktivačních roztoků	24
3.2.3.4.	Příprava extrakčního roztoku.....	24
3.2.3.5.	Příprava roztoku glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenasy	24
3.2.3.6.	Příprava roztoku kreatinfosfokinasy.....	24
3.2.3.7.	Příprava roztoku R5P	24
3.2.3.8.	Příprava roztoku 3-fosfoglycerátkinasy.....	24
3.2.3.9.	Příprava pracovního roztoku	25
3.2.4.	Extrakce enzymu	25
3.2.5.	Měření aktivity	25
3.2.5.1.	Počáteční aktivita.....	25
3.2.5.2.	Celková aktivita.....	25
3.2.6.	Výpočet aktivity enzymu Rubisco	25
4	Výsledky a diskuse.....	28

4.1.	Výsledky.....	28
4.2.	Diskuse.....	34
5	Závěr.....	35
6	Použitá literatura:	36
7	Seznam zkratek a symbolů.....	39

1 ÚVOD

Na počátku vývoje Země obsahovala atmosféra především dusík, oxid uhličitý, metan, čpavek, vodík a další plyny, ale nebyly v ní ani stopy kyslíku. Také první organismy, které vznikly na Zemi ve vodách, získávaly energii ze Slunce, ale kyslík ještě neuvolňovaly. Teprve před 3 miliardami let vznikly jednobuněčné organismy (sinice), které měly schopnost štěpit molekuly vody a do atmosféry uvolňovat kyslík. Tím se vytvořily podmínky pro přechod živých organismů z moří na souš a postupně vznikla dynamická rovnováha, kdy zelené fotoautotrofní rostliny pohlcovaly atmosférický CO_2 a do atmosféry uvolňovaly kyslík. Obsah kyslíku postupně stoupal až na dnešních 21 %, zatím co CO_2 klesal až pod 200 μmol na mol vzduchu.

V první polovině 18. století však člověk začal využívat fosilní paliva a do atmosféry se dostávalo stále větší množství CO_2 . V současné době dosahuje koncentrace CO_2 v atmosféře kolem 380 $\mu\text{mol mol}^{-1}$. Změny v koncentraci CO_2 v atmosféře nejsou v historii Země ničím neobvyklým, zcela novým jevem je však rychlost těchto změn. Za posledních 150 let se koncentrace CO_2 v atmosféře zvýšila o čtvrtinu a podle současných výpočtů by při zachování stávajícího trendu měla za 50 let dosáhnout 700 $\mu\text{mol mol}^{-1}$. Na takto rychlý nárůst koncentrace CO_2 nejsou rostliny schopny adekvátně reagovat a je tedy třeba velmi pozorně sledovat vliv změn koncentrace oxidu uhličitého na ekosystémy naší planety.

Zvýšená koncentrace CO_2 způsobuje změny v rychlosti fotosyntézy, fotorespirace, vodivosti průduchů a rychlosti dýchání.

Při krátkodobém zvýšení koncentrace CO_2 zpravidla dochází ke zvýšení rychlosti fotosyntézy, nárůstu biomasy a např. u obilnin ke zvýšení výnosů. Odezva rostlin na dlouhodobé působení zvýšené koncentrace CO_2 je rozmanitější. Po přechodném krátkodobém zvýšení rychlosti fotosyntézy zpravidla dochází k jejímu postupnému zpomalování, někdy až na původní úroveň. Tento jev se nazývá fotosyntetická aklimace nebo aklimační deprese.

Klíčovou sloučeninou v koloběhu CO_2 na Zemi je enzym ribulosa-1,5-bisfosfát-karboxylasa/oxygenasa neboli Rubisco. Tento enzym katalyzuje fixaci CO_2 do organické molekuly a představuje tak vstupní bránu anorganického uhlíku do biosféry. Rubisco se vyznačuje velmi malou molekulovou aktivitou, a proto ho musí být v rostlinách velké množství (30–50 % všech listových proteinů), aby se udržela přijatelná rychlost fotosyntézy. Enzym Rubisco se podílí rozhodující mírou na regulaci rychlosti fotosyntézy změnami své aktivity i obsahu.

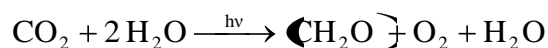
Tato práce studuje změny aktivity enzymu Rubisco v průběhu dne v podmínkách normální a zvýšené koncentrace oxidu uhličitého u buku lesního (*Fagus sylvatica*). Práce je součástí širšího výzkumného úkolu Ústavu systémové biologie a ekologie AV ČR, který sleduje dlouhodobý vliv zvýšené koncentrace CO_2 na základní fotosyntetické parametry jako jsou rychlost fotosyntézy, maximální rychlost karboxylace, obsah chlorofylů, sušiny, celkového dusíku, fluorescence aj.

2 TEORETICKÁ ČÁST

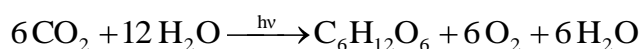
2.1. Fotosyntéza

Fotosyntéza je jeden z nejstarších a zároveň nejdůležitějších dějů v živé přírodě. Zachycuje sluneční energii a z jednoduché uhlíkaté sloučeniny – oxidu uhličitého vyrábí organickou hmotu pro výživu chemotrofních organismů. Fotosyntéza je hlavním producentem kyslíku naší planety, který je nezbytný pro existenci aerobních forem života.

Celý tento složitý děj můžeme rozdělit na primární procesy (přenos elektronů) a sekundární procesy (Calvinův cyklus). Podstatou fotosyntézy je přeměna energie slunečního záření na energii chemickou. Chemicky představuje fotosyntéza velmi náročný proces převedení uhlíku z nejméně oxidované formy o nízké energii, oxidu uhličitého na redukovaný materiál o vysoké energii (sacharidy). Ty slouží jako potrava pro výživu vyšších rostlin a živočichů. Fotosyntéza je endergonický redukční proces, při kterém energii poskytuje sluneční záření, zachycované chlorofylem (fotoreceptory) a redukčním činidlem je, alespoň u vyšších zelených rostlin, vodík z molekul vody. Redukce CO_2 na cukry je spojena s oxidací H_2O , vedoucí ke vzniku O_2 . Takový typ fotosyntézy se nazývá oxygenní. Kyslík vzniká jako sekundární produkt, ale je nejdůležitější podmínkou existence života na Zemi. Sumární rovnici oxygenní fotosyntézy lze v nejjednodušší formě formulovat takto:



Vznik monosacharidové jednotky je vyjádřen rovnicí:



U nižších fotosyntetizujících organismů (např. některých bakterií) jsou donory vodíku místo vody H_2S , H_2 nebo organické kyseliny a nedochází k uvolnění kyslíku. V takovém případě se jedná o anoxygenní fotosyntézu.

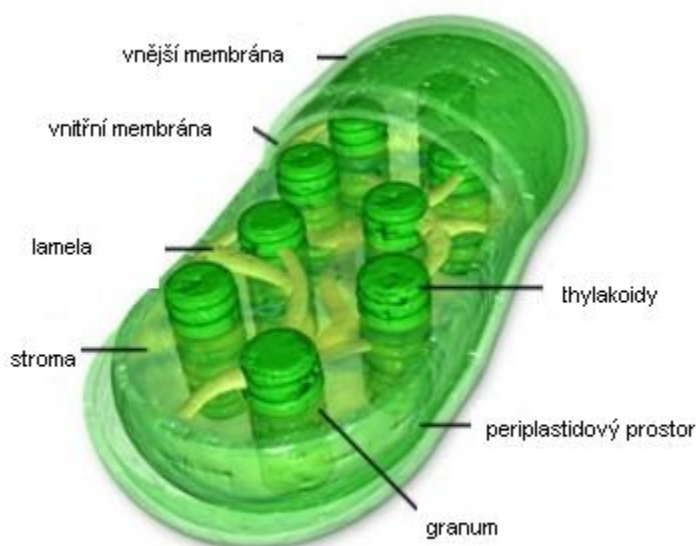
Fotosyntéza probíhá ve dvou na sebe navazujících fázích – světelné (za přítomnosti světla) a temnostní (bez přítomnosti světla). Světelná fáze je fotochemický děj, založený na přeměně energie fotonů slunečního záření na energii chemickou. Energie záření je nejprve změněna na energii excitovaných elektronů, která je využita při výrobě makroergických sloučenin jako ATP a NADPH.

Paralelně se světelnou fází probíhá i fáze temnostní. Ta už není jedinečná pro fototrofy. Temnostní fáze se skládá ze série enzymových reakcí, není bezprostředně závislá na světle a využívá se v ní NADPH, který byl nahromaděn v primárních procesech fotosyntézy. Energie uložená v ATP je potřebná k redukci CO_2 na organické produkty [1].

2.1.1. Fotosyntetický aparát

U eukaryotních fototrofů probíhá fotosyntéza v chloroplastech. Velikost, tvar i počet chloroplastů v buňce se liší podle druhu rostliny. Chloroplasty (obr. 2.1) mají elipsoidní tvar, a jejich délka se pohybuje v rozmezí 5-10 μm . Mají lamelární strukturu a podobají se mitochondriím, které se pravděpodobně z chloroplastů vyvinuly. Chloroplasty jsou tvořeny systémem membrán tvořících thylakoidy, které jsou uspořádány v grana. Výplň chloroplastů tvoří stroma, což je koncentrovaný roztok enzymů. Chloroplasty obsahují vlastní kruhovou dvouvláknovou DNA.

Fotosyntetický aparát je schopný absorbovat sluneční záření, proto obsahuje fotoreceptory. Jsou to zachycovače sluneční energie nazývané chlorofyly (chlorofyl *a*, *b*). Chlorofyly tvoří asi 1 % sušiny zelených částí rostlin. Jejich strukturu tvoří substituované tetrapyrroly. Chlorofyly *a* a *b* se vzájemně doplňují v pokrývání viditelné oblasti elektromagnetického záření. Chlorofyl *a* je modrozelený, *b* je žlutozelený. Chlorofyly jsou fotoreceptory díky jejich systému střídajících se jednoduchých a dvojných vazeb. Kromě molekul chlorofylu obsahují chloroplasty i některé další pigmenty např. karotenoidy, podílející se na absorpci světla v zelené oblasti, a zvyšují tak účinnost jeho zachycování [1], [5].



Obr. 2.1 Průřez chloroplastem. Převzato z [7].

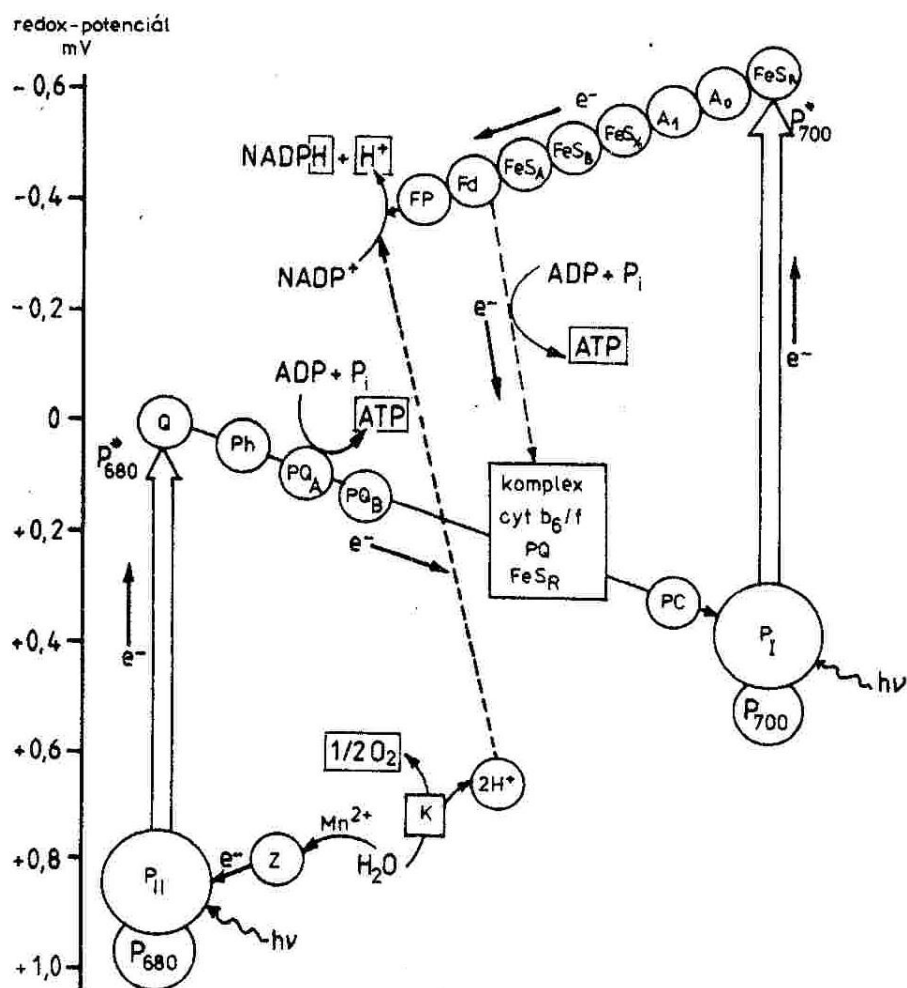
2.1.2. Světelná fáze fotosyntézy

Ve světelné fázi fotosyntézy (obr. 2.2) dochází k absorpci záření chlorofylovými molekulami, které jsou organizovány v thylakoidech. Chlorofyly jsou vázány na molekuly bílkovin, které jsou udržovány optimálně nasměrované tak, aby si mohly předávat absorbovanou energii prostřednictvím sběračů. Tato nashromážděná energie je přenesena na molekulu chlorofylu a v tzv. reakčním centru. Tato molekula má schopnost přeměnit energii fotonů na elektrickou energii. Podstatou této přeměny je přechod některých elektronů molekuly chlorofylu do hladiny o vyšší energii, takže mají negativnější redoxpotenciál.

Primární fáze fotosyntézy je závislá na světle a probíhá v chloroplastové membráně thylakoidů. Při oxygení fotosyntéze spolupracují dva fotosystémy. Oba fotosystémy jsou umístěny odděleně a jsou propojeny řetězcem transelektronas.

Fotosystém I (P_I) obsahuje převážně molekuly chlorofylu *a*, s absorpčním maximem asi 700 nm. Molekula chlorofylu reakčního centra (označovaná P_{700}) má v základním stavu (ve tmě) redoxpotenciál $E = 0,45$ V. Přenosem fotonu ze sběračových molekul dochází k redistribuci elektronů molekuly P_{700} a jejímu přechodu do excitovaného stavu P_{700}^* s potenciálem $E = 0,55$ V. Excitované elektrony jsou přeneseny z molekuly P_{700}^* na oxidoreduktasu ferredoxin, vázaný na thylakoidovou membránu. Ten přenesse elektrony na rozpustný ferredoxin, jehož redukovaná forma předá prostřednictvím flavoproteinu elektrony

Fotosystém II (P_{II}) obsahuje molekuly chlorofylu *a* i *b*. Absorpční maximum P_{II} je asi 680 nm. Molekula chlorofylu reakčního centra (označovaná P₆₈₀) má ve tmě redoxpotenciál E = 0,82 V. Ozáření přejde do excitovaného stavu P₆₈₀* s redoxpotenciálem E = 0 V. Excitované elektrony jsou poté přenášeny systémem oxidoreduktas o stoupajícím redoxpotenciálu a zaplní mezery v molekule chlorofylu reakčního centra P₇₀₀ fotosystému I, což způsobí přechod zpět do základního stavu. Uvolněním elektronů z P₆₈₀* a jejich přechodem na P₇₀₀ vznikne oxidovaná forma chlorofylu P₆₈₀. Ta pomocí iontů Mn²⁺ oxiduje vodu za uvolnění O₂. Elektrony odebrané vodě redukují P₆₈₀ a protony jsou použity při redukci NADP⁺, prováděné fotosystémem I za uvolnění O₂.



Obr. 2.2 Schéma oxygenní fotosyntézy. Převzato z [1].

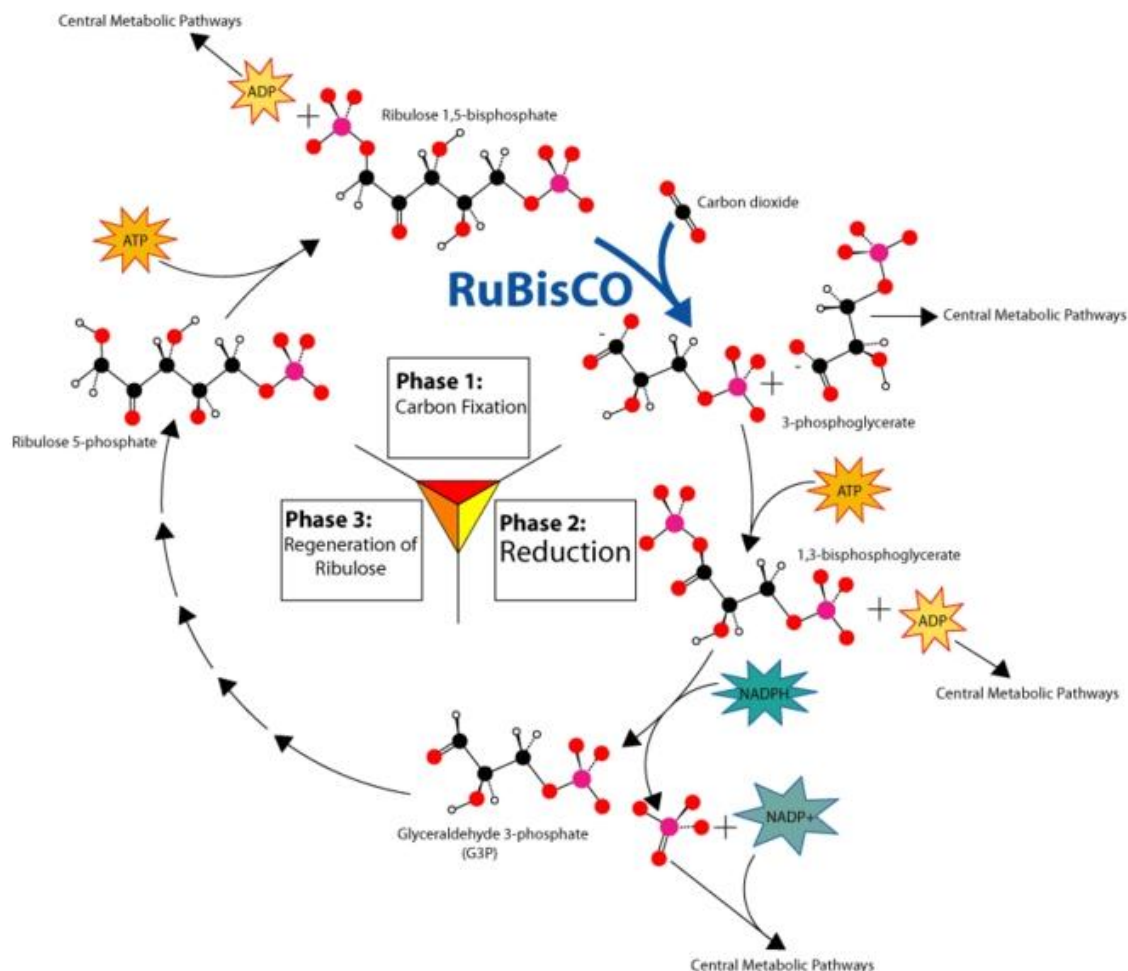
2.1.3. Temnostní fáze fotosyntézy (Calvinův cyklus)

Temnostní fáze je biosyntéza sacharidů z CO_2 za pomoci redukčního činidla NADPH a energie ATP, probíhající ve stromatu chloroplastů. Pro svůj průběh nepotřebuje světelnou energii a může probíhat i ve tmě do vyčerpání zásob ATP a NADPH nahromaděných z primární fáze. Soubor dějů odehrávajících se v sekundární fázi se nazývá Calvinův cyklus. Ten se skládá z produkční a regenerační fáze. Klíčovou úlohu v Calvinově cyklu hraje enzym ribulosa-1,5-bisfosfátkarboxylasa (Rubisco), který katalyzuje zabudování molekuly CO_2 do organické sloučeniny. Tento děj se skládá ze tří fází: (1) Fixace CO_2 v organické sloučenině: slouží k převedení energeticky chudé, neaktivní formy CO_2 na aktivovanou redukovatelnou formu. Probíhá jako začlenění CO_2 do molekuly ketopentosy ribulosa-1,5-bisfosfátu (RuBP) a rozpad vzniklého šesti uhlíkatého produktu na dvě molekuly 3-fosfoglycerátu. (2) Redukce 3-fosfoglycerátu NADPH za spotřeby 2 molekul ATP na 1,3-bisfosfoglycerát z něhož vzniká glyceraldehyd-3-fosfát. Z glyceraldehyd-3-fosfátu vzniká izomerací dihydroxyacetonfosfát. Část trios se dostává do cytosolu, kde dochází k přeměně na fruktosa-1,6-bisfosfát ze kterého vzniká glukosa-6-fosfát. (3) Regenerace akceptoru CO_2 (obrácená regenerační fáze pentosového cyklu). Z pěti molekul hexos se při ní regeneruje šest molekul pentos.

V redukční fázi se redukuje 3-fosfoglycerát s NADPH na glyceraldehyd-3-fosfát za spotřeby 2 ATP. Z glyceraldehyd-3-fosfátu poté izomerací vzniká dihydroxyacetonfosfát. Část trios přechází do cytosolu, kde se aldolovou kondenzací přeměňují na fruktosa-1,6-bisfosfát a po odštěpení fosforylové skupiny vzniká glukosa-6-fosfát. Z glukosy vznikají rezervní sacharidy, sacharosa a škrob. Některé triosafosfáty se využijí na výrobu lipidů nebo aminokyselin pro růst rostlin. Aby z molekuly CO_2 vznikla hexosa, musí se cyklus opakovat šestkrát a musí být při tom regenerováno šest molekul ribulosa.

C_3 -rostliny (většina rostlin a řas) používají k fixaci CO_2 Calvinův cyklus. C_4 -rostliny mají jako primární akceptor CO_2 fosfoenolpyruvát a meziproduktem je oxalacetát, který se přeměňuje na malát a aspartát.

Calvinův cyklus (obr. 2.3) má v metabolismu rostlin nepostradatelnou roli. Vyrobený hexosafosfát je využit v chloroplastech jako materiál pro syntézu škrobu. Část fosfoglycerátu může být zpracována enzymy glykolýzy za vzniku pyruvátu nebo se z něj může tvořit sacharosa, která je důležitou transportní formou sacharidů [1], [22].



Obr. 2.3 Schéma Calvinova cyklu. Převzato z [34].

2.2. Rubisco

Nepochybně nejdůležitější roli ve fixaci CO_2 hraje enzym ribulosa-1,5-bisfosfát-karboxylasa/oxygenasa neboli Rubisco. Je to nejhojněji rozšířený a snad i nejvýznamnější protein na Zemi, protože představuje jediný kvantitativně významný spojovací článek mezi zásobou anorganického a organického uhlíku v biosféře [21].

Rubisco objevili Wildman a Bonner v roce 1947, jako hlavní rozpustnou bílkovinu v extraktu rostlinných listů. Neměli o něm žádné informace a nazývali ho protein Frakce I.

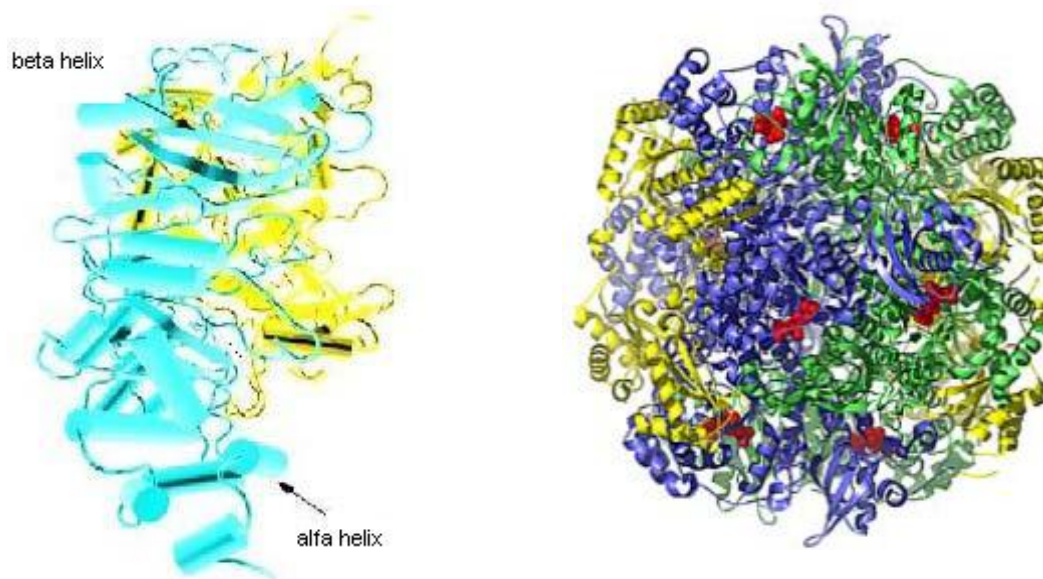
V roce 1965 bylo objeveno, že katalyzuje karboxylaci ribulosa-1,5-bisfosfátu a o několik let později byla objevena jeho druhá hlavní katalytická aktivita - oxygenace ribulosa-1,5-bisfosfátu. Enzym byl nazván ribulosa-1,5-bisfosfátkarboxylasa/oxygenasa a postupně se pro něj vžila zkratka Rubisco.

Enzym Rubisco byl studován více než všechny ostatní rostlinné enzymy. Posttranskripční úprava enzymu Rubisco probíhá za účasti chaperonů. Struktura byla studována rentgenovou krystalografií a jinými technikami s překvapivým zjištěním kolik reakcí Rubisco katalyzuje.

2.2.1. Struktura enzymu Rubisco

Rubisco má u vyšších rostlin komplexní kvartérní strukturu, vysokou relativní molekulovou hmotnost (560 000), několik vazebných míst pro substrát, kofaktory, inhibitory, protilátky a je složeno z neidentických podjednotek [17].

Rubisco je asi nejrozšířenější bílkovina celé biosféry. Je to allosterický enzym z třídy ligas. Má globulární strukturu (obr. 2.4) a tři strukturně odlišné, ale funkčně analogické formy. Forma I (L_8S_8) tvoří hexadekamer a byla nalezena u vyšších rostlin, řas, cyanobakterií a mnoha autotrofních bakterií obsahuje osm velkých podjednotek (56 kDa) L a osm malých podjednotek S (14 kDa). Forma II (L_2) je dimer a byla nalezena u obrněnek a některých druhů autotrofních bakterií včetně obligátních anaerobů. Rubisco archebakterií je dekamer (L_2)₅ [21].



Obr. 2.4 Struktura Rubisco - vlevo forma II (L_2), vpravo forma I (L_8S_8).

Forma II se skládá ze dvou podjednotek, vyznačeny žlutou a modrou barvou. Šipky vyznačují β -strukturu (β -helix) a α -helix. Převzato z [29].

Forma I se skládá z osmi velkých podjednotek (modrá a zelená barva) a z osmi malých podjednotek (žlutá a světle modrá barva). Aktivní místa jsou vyznačena červenou barvou. Převzato z [6].

U zelených řas a vyšších rostlin se Rubisco vyskytuje v chloroplastech a velká podjednotka L je zakódována v chloroplastovém geonomu [18]. Malá podjednotka S je syntetizována v cytoplazmatických ribosomech a je importována do chloroplastu. Podjednotka se skládá ze dvou domén – malé N-terminální domény a velké C-terminální domény. Malá N-terminální doména je tvořena pěti úseky s β -strukturou a dvěma α -helixy umístěnými na jedné straně β -struktury. Velká C-terminální doména má soudkovitý tvar, složený z osmi struktur. Významným strukturním rysem velké C-terminální domény je existence ohebné smyčky (loop 6) [21].

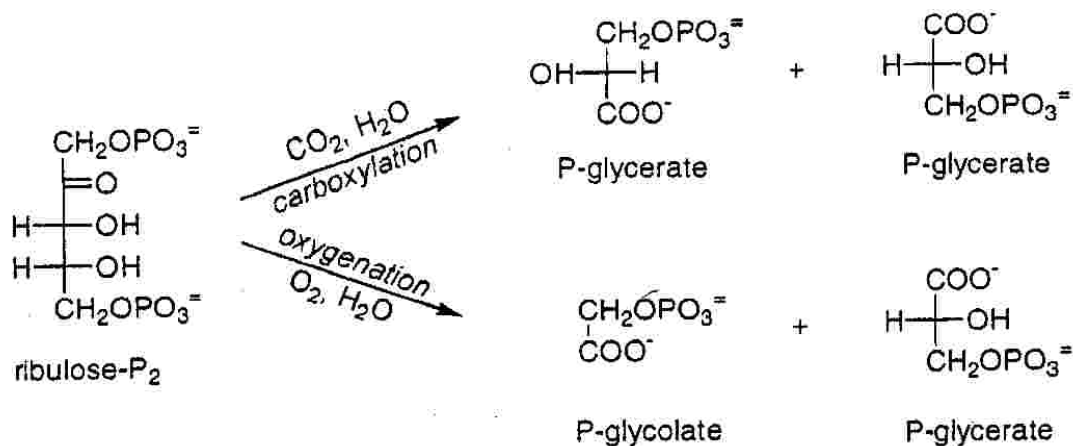
Ačkoliv bylo dlouho známo, že aktivita Rubisco může být zvýšena preinkubací s oxidem uhličitým a Mg^{2+} , podrobně začal být tento jev studován teprve v polovině 70. let. Aktivace je reverzibilní rovnovážný proces, kde ustavení rovnováhy závisí na rovnovážné koncentraci CO_2 , kovového iontu M^{2+} a protonů [19].

Aby Rubisco bylo katalyticky aktivní, musí nejprve dojít k aktivaci katalytického centra. Prvním krokem je reverzibilní karbamylace ϵ -aminokyseliny postranního řetězce lysinu za vzniku karbamátu a poté vznik koordinační vazby s Mg^{2+} . Karbamylace probíhá pomalu a určuje rychlost celé aktivace. Tato vazba probíhá pouze v nadbytku Mg^{2+} a v alkalickém prostředí. Na takto vytvořené aktivní místo se váže substrát ribulosa-1,5-bisfosfát [4]. Aktivní místo leží na rozhraní mezi N-terminální doménou jedné a C-terminální doménou druhé podjednotky, proto samotná podjednotka nemůže mít katalytickou aktivitu [22].

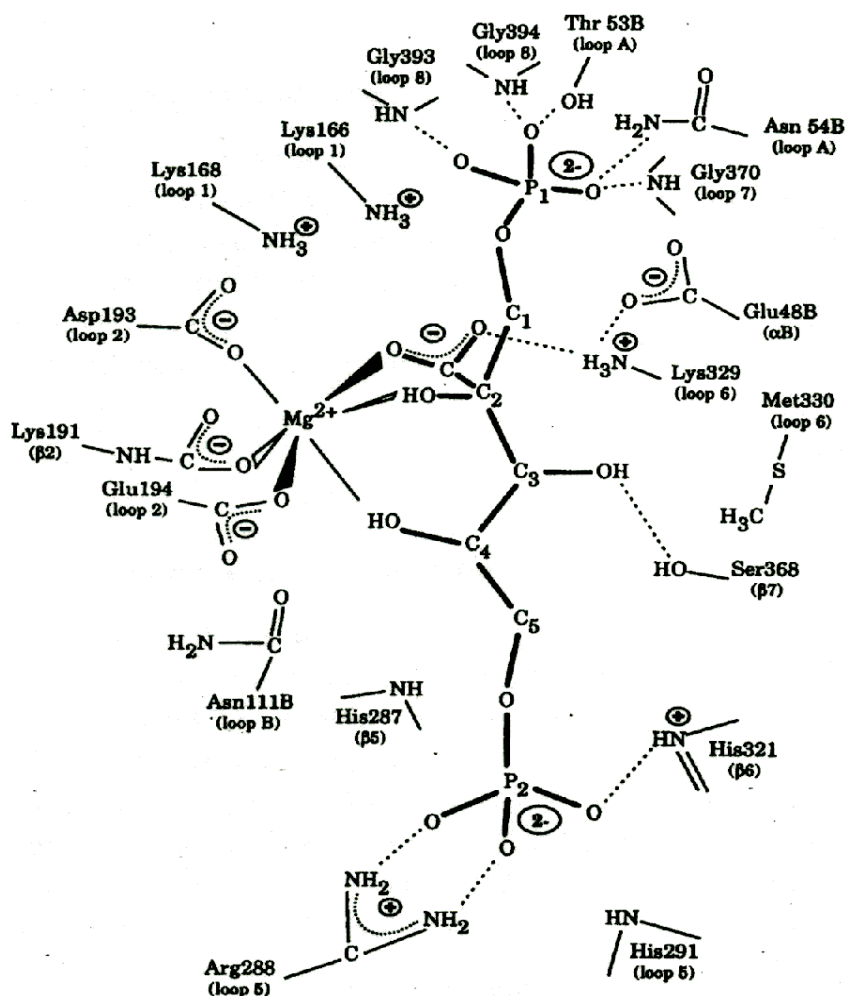
Aktivované Rubisco je bifunkční (obr. 2.5), protože může katalyzovat dva druhy reakcí karboxylaci a oxygenaci ribulosa-1,5-bisfosfátu. Příčinou dvojí funkce enzymu je podobná struktura CO_2 a O_2 , které jsou konkurenty při vazbě na aktivní místo.

U karboxylace dochází k přesmyku ribulosa-1,5-bisfosfátu na enol-formu. Rubisco váže CO_2 na enol-formu za vzniku nestabilního meziprojektu, který se hydrolyzuje na dvě molekuly 3-fosfoglycerátu. Podstatou celé karboxylace je stabilizace přechodného meziprojektu 2-karboxyarabinitol-1,5-bisfosfátu vlivem komplexu karbamátu s kovovým iontem Mg^{2+} . Při navázání CO_2 proběhne Calvinův cyklus a ze dvou molekul 3-fosfoglycerátu vznikají dvě molekuly glycerinaldehyd-3-fosfát. Nakonec dochází k regeneraci ribulosa-1,5-bisfosfát a spojení dvou molekul glycerinaldehyd-3-fosfát za vzniku sacharidu [22].

Při oxygenaci dochází ke štěpení meziprojektu 2-pery-3-ketoarabinitol-1,5-bisfosfátu a přímo se uvolňuje molekula 3-fosfoglycerátu a molekula 2-fosfoglykolátu - začátek glykolátové cesty [23].



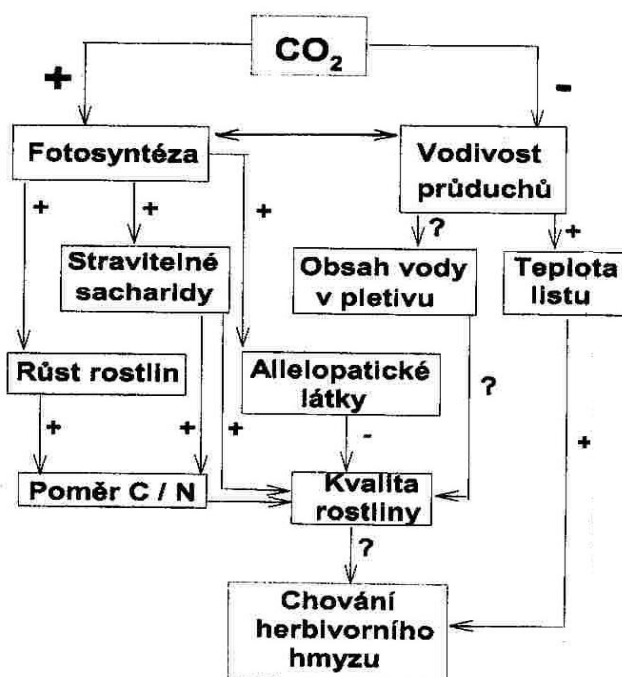
Obr. 2.5 Karboxylace a oxygenace katalyzovaná enzymem Rubisco. Převezato z [4].



Obr. 2.6 Aktivní místo enzymu Rubisco. N-terminální doména je tvořena Glu48, Thr53, Asn53 a Asn111, všechny ostatní zbytky jsou umístěny v β/α – stočené doméně přiléhající podjednotky. Nejdůležitější v aktivním místě je Lys191, jehož ϵ -aminoskupina je karbamylována molekulou CO_2 a vzniklý karbanmát se stabilizuje koordinací s Mg^{2+} . Na takto karbamylované aktivní místo se navazuje RuBP a na jeho uhlík C_2 se navazuje molekula vzdušného CO_2 . Převzato z [36].

2.3. Vliv zvýšené koncentrace CO_2 na rostliny

Zvýšená koncentrace CO_2 působí na rostliny (obr. 2.7) jednak přímo, jednak nepřímo. Mezi přímé účinky zvýšené koncentrace CO_2 jsou zahrnuty změny v rychlosti fotosyntézy, fotorespirace, vodivosti průduchů a v mitochondriální respiraci. Přímé účinky většinou vyvolávají celou kaskádu řetězových změn, na kterých se mohou podílet i nepřímé účinky. K nepřímým účinkům patří změny teploty, obsahu minerálních látek v půdě, obsah dusíku a vody atd.[2].



Obr. 2.7 Schéma nepříznivých vlivů zvýšené koncentrace CO_2 na rostliny. Zvýšení naznačuje (+), snížení (-) nebo neznámé působení. Převzato z [2].

2.3.1. Přímé účinky CO_2 na rostliny

Přímé účinky oxidu uhličitého na rostliny se projevují změnami v rychlosti fotosyntézy, fotorespirace a vodivosti průduchů. Je nutné počítat i s významnými interakcemi mezi uvedenými procesy. Například pokles obsahu dusíku může vést ke změně růstové a udržovací složky dýchání nebo poklesu vodivosti průduchů.

2.3.1.1. Rychlost fotosyntézy

U rostlin, které jsou pěstovány v prostředí s vyšší koncentrací CO_2 se rychlost fotosyntézy zvyšuje, ale při dlouhodobé expozici dochází naopak ke snížení rychlosti fotosyntézy, snížení aktivity nebo množství enzymu Rubisco a dalších enzymů vázaných na Calvinův cyklus. Takovému jevu se říká aklimace. Aklimací se rozumí soubor fyziologických změn, k nimž dochází při dlouhodobé kultivaci rostlin při zvýšené koncentraci CO_2 [2]. To znamená, že fotosyntetická charakteristika listů, které se vyvinuly již v podmínkách zvýšené koncentrace CO_2 , se liší od charakteristiky listů rostlin, které byly v předchozím období kultivovány při okolní koncentraci CO_2 . Nejnápadněji se tato aklimace projevuje postupným poklesem rychlosti čisté fotosyntézy. Marek et al. [14] prokázali, že po přechodném vzestupu rychlosti fotosyntézy dochází při dlouhodobé kultivaci v podmínkách zvýšené koncentrace CO_2 k poklesu rychlosti fotosyntézy a obsahu chlorofylů. Obecně se předpokládá, že pokles rychlosti fotosyntézy při aklimaci rostlin dlouhodobě pěstovaných při zvýšené koncentraci CO_2 je způsoben zpětnovazebným účinkem asimilátů akumulovaných v listu na expresi genů.

Pro aklimaci jsou dva důvody:

(1) Rostlina není schopna využít nadbytečné asimiláty, proto reaguje poklesem aktivity jejich zdrojů.

(2) Pro fotosyntézu při zvýšené koncentraci CO_2 , je postačující menší množství Rubisco. Například v přehledu zahrnujícím osm prací s jedenácti druhy rostlin se ukázalo, že snížení aktivity Rubisco dosahuje při vyšší koncentraci CO_2 , asi 24 % [8].

Výsledkem vyšší rychlosti fotosyntézy může být také změna kvality biomasy s následnými příznivými nebo nepříznivými následky pro herbivorní faunu. Další nepříznivý dopad může být reakce jednotlivých druhů rostlin, což může vést ke změně druhového složení daného ekosystému a k ovlivnění biodiverzity.

2.3.1.2. *Rychlost respirace*

V podmínkách současné atmosféry je u rostlin C_3 poměr fixace CO_2 : O_2 asi 3:1 [2]. U rostlin C_4 je fotorespirace zanedbatelná. Fotorespirace je plně inhibována snížením koncentrace O_2 na 5 % a méně nebo dvoj- až trojnásobným zvýšením koncentrace CO_2 . Vzestup koncentrace CO_2 ve vzduchu obklopujícím list působí dvojím způsobem:

- a) Zvýšení koncentrace substrátu (CO_2) zvyšuje rychlost karboxylace, a tedy fotosyntézy.
- b) Zvýšení koncentrace CO_2 zvyšuje hodnotu poměru koncentrace CO_2/O_2 , a tím snižuje fotorespiraci, tedy ztráty CO_2 . To představuje další zvýšení rychlosti čisté fotosyntézy.

2.3.1.3. *Vodivost průduchů*

Změna koncentrace CO_2 v atmosféře obklopující list ovlivňuje míru otevřenosti průduchů. Reakce průduchů na změny koncentrace CO_2 je popsána pouze fenomenologicky. Zvýšení koncentrace CO_2 vyvolává u většiny rostlin přivření průduchů. Drake et al. [8] zjistili, že průměrné snížení vodivosti průduchů při zdvojnásobení atmosférické koncentrace CO_2 činí 20 %.

Pokles vodivosti, který je způsobený zvýšením koncentrace CO_2 kolem listu nemusí vždy vést k poklesu rychlosti čisté fotosyntézy, protože současně se zvyšuje gradient koncentrace CO_2 mezi atmosférou a místem karboxylace, což fotosyntézu stimuluje.

Snížená rychlost transpirace modifikuje jednotlivé složky energetické bilance listu, což se promítá i ve změně jejich teploty. Bylo dokázáno, že zvýšení teploty listů zvýšenou koncentrací CO_2 je přímo úměrné poklesu vodivosti průduchů.

Nebylo prokázáno, že by docházelo k aklimaci vodivosti průduchů během dlouhodobé kultivace rostlin při zvýšené koncentraci CO_2 . Naproti tomu je aklimaci přisuzován pokles frekvence (hustoty) průduchů na listech rostlin dlouhodobě pěstovaných při zvýšené koncentraci CO_2 . Peñuelas a Matamala [20] prokázali, že frekvence průduchů v polovině 18. století byla o 21 % vyšší, než je v současné době.

2.3.1.4. *Rychlost dýchání*

Ve srovnání s rychlostí čisté fotosyntézy je rychlost dýchání relativně pomalá. Dýchání probíhá nejen v noci, kdy je fotosyntéza nulová, ale i ve dne. Rychlost denního dýchání je nižší než rychlost dýchání v noci. Dýcháním se rozkládají produkty fotosyntézy, nejčastěji cukry, ale současně se vytvářejí uhlíkové skelety, zdroje pohotové energie ve formě ATP a redukčních ekvivalentů ve formě NAD(P)H. Dýchání je také nezbytné pro transport látek v rostlině (transportní složka dýchání), příjem iontů minerální výživy a jejich asimilaci.

Jednu z mála prací prokazujících přímý vliv zvýšené koncentrace CO_2 na dýchání rostlin uveřejnili González-Meler [9]. Zvýšenou koncentrací CO_2 prokázali inhibici oxidace externě dodaného sukcinátu nebo NADH k suspenzi mitochondrií izolovaných z děloh sóje luštěnaté. Přitom zjistili, že zvýšenou koncentrací CO_2 je inhibována aktivita sukcinátdehydrogenasy

i cytochrom-c-oxidasy. To znamená, že alespoň část inhibičního účinku CO₂ na dýchání může být lokalizována přímo v mitochondriích.

2.3.2. Nepřímé účinky CO₂ na rostliny

2.3.2.1. *Vliv teploty*

Vedle změny koncentrace skleníkových plynů je změna globálního klimatu nejčastěji spojována se změnami teplot. Význam teploty je v této souvislosti o to větší, že se nepředpokládá její rovnoměrné zvýšení na celé zeměkouli.

Zvýšení koncentrace CO₂ zvyšuje teplotní optimum fotosyntézy. To znamená, že relativní pokles rychlosti fotosyntézy při teplotách přesahujících teplotní optimum rostlin pěstovaných v okolní koncentraci CO₂ je kompenzován právě posunutím tohoto optima [12]. Přitom tato změna optima může činit až 5 °C při zdvojnásobení okolní koncentrace CO₂. S teplotou také klesá kvantový výtěžek fotosyntézy, tj. počet molů CO₂ fixovaného absorpcí jednoho molu fotonu.

Kompenzační ozářenost, což znamená ozářenost, při níž je příjem a výdej CO₂ listu v rovnováze, s teplotou silně stoupá. Opět zvýšená koncentrace CO₂ zejména při zvýšených teplotách tuto kompenzační ozářenost silně snižuje [13]. To vše se pak promítá v relativní stimulaci rychlosti fotosyntézy při nízké a při zvýšené koncentraci CO₂.

Vyšší teploty podporují spotřebu asimilátů při růstu nebo jejich akumulaci v zásobních orgánech, takže případná inhibice fotosyntézy se ani při dlouhodobé kultivaci rostlin při zvýšené koncentraci CO₂ nemusí projevit. Proto může mít zvýšená koncentrace CO₂ příznivý vliv i v podmínkách stresu vyvolaného vysokými teplotami.

Zvýšená koncentrace CO₂ snižuje vodivost průduchů a tím klesá rychlost transpirace a zvyšuje se teplota rostliny. Zvýšení rychlosti fotosyntézy zvýšenou koncentrací CO₂ může být zesíleno, pokud dojde současně ke zvýšení teploty v rozmezí teplotního optima a optima fotosyntézy. Teplota má velký vliv na rychlost dýchání, protože zvyšováním teploty klesá poměr rychlosti fotosyntézy a rychlosti dýchání. Samotné zvýšení teploty mění poměr CO₂ ku O₂ v místě karboxylace ve prospěch O₂ a podporuje tak fotorespiraci.

2.3.2.2. *Příjem minerálních živin*

Účinek zvýšené koncentrace CO₂ má vliv také na příjem a obsah minerálních živin v rostlině, ale i živiny mohou naopak ovlivňovat fotosyntézu a produkci rostlin. Při zvýšené koncentraci CO₂ se projevuje nerovnováha mezi aktivitou kořenů a listů, což se projevuje ve zvýšeném poměru C/N v sušině rostlin [2].

Právě zvýšená koncentrace CO₂ je příkladem, že i při dostatku N může dojít k nadměrné produkci asimilátů neboli nedostatečnému zásobení rostlin dusíkem.

Všechny biogenní prvky hrají nezastupitelnou roli ve výživě rostlin, a proto jsou tedy stejně významné. Ale přece jen mimořádné postavení zaujímá dusík. Je to nejspíš způsobeno tím, že se dusík vyskytuje ve všech minerálních živinách v nejvyšším množství, ale i tím, že je přítomen ve všech bílkovinách a enzýmech.

Z celkového množství dusíku obsaženého v nadzemních částech rostlin v době sklizně musí být celá polovina přijata do doby, než jejich sušina dosáhne čtvrtiny konečné hmotnosti. To ukazuje na nezbytnost věnovat více pozornosti příjmu dusíku zejména v raných fázích

růstu rostlin. Malé rezervy dusíku ve vegetativních orgánech totiž znamenají, že zvýšené množství dusíku je odebráno i rozkladem enzymů v listech, což vede k předčasnému poklesu rychlosti fotosyntézy s následným omezením výnosu.

Při nedostatečném množství dusíku dochází u rostlin kultivovaných při zvýšené koncentraci CO_2 k rychlejšímu rozkladu enzymů a to hlavně enzymu Rubisco. Rubisco představuje největší podíl ze všech enzymů nacházejících se v listech. V tomto enzymu je také obsažena podstatná část veškerého dusíku v listech. Při zvýšené koncentraci CO_2 je umožněna vyšší rychlost fixace CO_2 , která vyžaduje menší množství enzymu Rubisco a tím i menší množství dusíku. Účinnost využití dusíku je definována jako rychlost fotosyntézy vztažená na obsah dusíku v listech. Zvýšení koncentrace CO_2 vede k poklesu obsahu dusíku v listech a to o 15–20 % [2]. To je způsobeno vyšším obsahem sacharidů, ale i poklesem obsahu fotosyntetických bílkovin.

2.3.2.3. Vliv CO_2 na spotřebu vody

Nejvíce vody uvolní rostliny do ovzduší transpirací, tj. difuzí vodní páry z povrchu buněk do volné atmosféry. Zvýšená koncentrace CO_2 ovlivňuje přivření průduchů, což způsobuje zvýšení hodnoty stomatálního odporu proti difuzi vodní páry. Za jinak nezměněných podmínek dojde k poklesu rychlosti transkripce, což způsobí zvýšení účinnosti využití vody. Zvýšená koncentrace CO_2 zvyšuje celkovou biomasu a velikost listové plochy, což vyvolá zvýšený příjem a výdej vody. To může mít nepříznivý dopad především pro ekosystémy na místech s omezenou dostupností vody. Některé rostliny přizpůsobené na běžné podmínky vystačí s daným množstvím vody až do konce vegetace. Naproti tomu při zvýšené koncentraci CO_2 mohou být zásoby vody spotřebovány ještě před koncem vegetace a mohou tak způsobit vyhytnutí některých druhů rostlin [2].

Za jinak nezměněných podmínek může dojít k poklesu rychlosti transkripce, což se projeví ve zvýšené účinnosti využití vody. Obecně převládá názor, že v podmínkách zvýšené koncentrace CO_2 se rostliny rozšíří i do oblastí, kde byl jejich růst omezen nedostatkem vody.

2.4. Rostliny C_3 a C_4

Rostliny se dělí do tří skupin podle způsobu fixace CO_2 : rostliny C_3 , rostliny C_4 , a rostliny CAM (Crassulacean Acid Metabolism). Základem dělení rostlin C_3 a C_4 je chemická struktura prvního stabilního produktu karboxylace. U rostlin C_3 , které tvoří asi 95 % všech druhů rostlin na Zemi [15] je prvním produktem fosfoglycerát obsahující tři atomy uhlíku v molekule, zatímco u rostlin C_4 vzniká nejprve oxalacetát se čtyřmi atomy uhlíku v molekule. Karboxylační enzym rostlin C_3 , Rubisco váže na substrát (pětiuhlíkatý cukr ribulosa-1,5-bisfosfát) nejen molekulu CO_2 , ale i molekulu O_2 . Tato reakce s kyslíkem je podstatou fotorespirace.

Při sledování vlivu CO_2 na rychlost fotosyntézy je typická závislost, kde rostliny C_4 jsou při stávající koncentraci CO_2 satureovány, zatímco rostliny C_3 reagují na další zvýšení koncentrace CO_2 zvýšením rychlosti fotosyntézy. Toto je jeden ze základních rozdílů mezi rostlinami C_3 a C_4 , který je velmi důležitý při hodnocení vlivu změny složení atmosféry na rostliny. Z tohoto rozdílu se odvíjí další rozdílné důsledky zvyšující se koncentrace na růst a produktivitu rostlin C_3 a C_4 .

Ve fotosyntéze rostlin C_3 hraje hlavní roli množství a aktivita enzymu Rubisco. Podle názoru Theobalda et al. [10] je při zvýšené koncentraci CO_2 maximální rychlost karboxylace úměrná obsahu Rubisco, zatímco při saturaci světlem se jedná o úměrnost s obsahem

thylakoidní ATP-syntasy. Přitom bylo potvrzeno, že druhy rostlin ze skupiny C_4 (v tomto případě kukuřice setá, *Zea mays*) na zvýšenou koncentraci CO_2 prakticky nereagovaly.

Mnoho prací popisuje rozdílnou reakci jednotlivých rostlin na zvýšenou koncentraci CO_2 . Poorter [11] shrnul ve své práci údaje o 156 druzích rostlin, u nichž při zvýšené koncentraci CO_2 činila průměrná stimulace růstu 37 %. Hmotnost sušiny se zvýšila v průměru o 41 % pro druhy C_3 a 22 % pro druhy C_4 . Kulturní rostliny reagovaly na vyšší koncentraci CO_2 víc (58 %) než planě rostoucí (35 %).

2.5. Účinky zvýšené koncentrace CO_2 na stromy

Saxe et al. [30] se zabývali vztahem dřevin a koncentrace CO_2 a poukázali na skutečnost, že zatímco před 360 miliony až 280 miliony let lesy ovlivňovaly atmosférickou koncentraci oxidu uhličitého jeho hromadění v produktech, které se přeměnily v část současných fosilních paliv, tak jejich dnešním spalováním se zase CO_2 v atmosféře zvyšuje.

Pro dřeviny je charakteristická především tvorba sekundárních pletiv, která jim poskytuje dostatečnou pevnost i při velkých výškách kmenů, která je způsobena zejména velkou investicí uhlíku do buněčných stěn. Tyto materiální i energetické náklady jsou kompenzovány dlouhou dobou životnosti těchto rostlin. Dřeviny se také vyznačují produkcí velkého množství těkavých látek souvisejících s tzv. sekundárním metabolismem, jako izopren, monoterpeny, aldehydy, alkoholy a karboxylové kyseliny.

Dlouhá doba života i velká výška kmenů komplikuje provádění pokusů se stromy v jejich přirozeném prostředí. Počet pokusů prováděných se stromy je nepřímě úměrný jejich výšce. S tím souvisí i konstatování Ceulemanse a Rousseauové [37], že naše neznalost toho, jak stromy reagují na změnu klimatu, je přímo úměrná jejich velikosti. Velikost stromů má velké důsledky na bilanci C: mnohem více CO_2 je fixováno v biomase dospělého stromu.

Malé až zdnlivě zanedbatelné změny vnějších podmínek mohou vést zejména ve stadiu mladých rostlin k obdobně nepostřehnutelným změnám fyziologie nebo morfologie stromů. Další vývoj může však tyto změny natolik zesílit, že se objeví překvapivé důsledky, jejichž původ se mnohdy těžko zjišťuje.

Stromy nepředstavují homogenní skupinu rostlin, proto jednotlivé druhy mají zcela odlišný průběh roční fotosyntézy, rozdílný obsah dusíku v pletivech apod. [31]. Zdá se, že zvýšená koncentrace CO_2 zvyšuje rychlost vývoje především v počátečních fázích.

Základní otázka většiny dlouhodobých studií dřevin spočívá v tom, zdali lesní ekosystémy jsou schopny při zvýšené koncentraci CO_2 zvyšovat také množství ukládaného uhlíku. Je to součást obecného problému, do jaké míry je suchozemská vegetace sinkem či zdrojem CO_2 . Působí-li lesy jako významný sink, tak jimi lze do značné míry řešit problematiku zvyšující se koncentrace CO_2 . Pozitivní roli v růstu akumulovaného C v lesních společenstvech však může hrát i přirozená depozice dusíkatých sloučenin, jejichž množství se v posledních dekádách rovněž zvyšuje.

Lesní společenstva hromadí největší množství C v podzemních orgánech. Dále pak samotné kmeny ukládají 20 až 40 % C akumulovaného v nadzemní biomase. Také v listech dřevin pěstovaných při vyšší koncentraci CO_2 je zvýšený obsah nestrukturních polysacharidů. Na tomto zvýšení se podílí nejen škrob, ale v řadě případů i jednoduché cukry [2].

2.6. Metody stanovení aktivity Rubisco

Ke stanovení aktivity enzymu Rubisco se používají metody přímé a nepřímé. Mezi přímé metody patří metody spektrometrické a radiometrické. Nejrozšířenější nepřímou metodou je stanovení aktivity Rubisco pomocí gazometrické metody, při níž se měří dynamika výměny plynů při fotosyntéze.

2.6.1. Spektrofotometrické stanovení

Spektrofotometrické stanovení *in vitro* patří k přímým metodám. Toto stanovení aktivity Rubisco využívá změny absorbance při 340 nm. Ke změně absorbance dochází oxidací NADH ve spřaženém systému prvních tří reakcí spojených s Calvinova cyklu [24]. V reakční směsi jsou látky (enzymy), které katalyzují fixaci CO₂ RuBP za vzniku 3-fosfoglycerátu a redukci 3-fosfoglycerátu na glyceraldehyd-3-fosfát pomocí NADH. Oxidace NADH je provázena poklesem absorbance, z něhož je možno určit aktivitu Rubisco podle Lambertova-Beerova zákona. [22],[3]. Přesný postup je popsán v kapitole 3.2.

2.6.2. Radiometrické stanovení

Radiometrická metoda patří mezi přímé metody a je založena na zabudování radioaktivní molekuly ¹⁴CO₂ do molekuly ribulosa-1,5-bisfosfátu. Reakční směs musí být zbavena veškerého CO₂ a uhličitánů a reakce je aktivována známým množstvím extraktu aktivovaného enzymu. Reakce je zastavena po 30 až 60 sekundách pomocí přídavku HCl, čímž dochází k inaktivaci enzymu Rubisco a uvolnění nadbytečného ¹⁴CO₂, který se kvantitativně odstraní, a poté se změří radioaktivita produktu, která odpovídá množství asimilovaného ¹⁴CO₂ [3].

2.6.3. Gazometrické stanovení

Gazometrické stanovení *in vivo* patří k nepřímým metodám. Při této metodě se používá moderních komerčních přístrojů, které jsou rychlé, nedestruktivní a umožňují měření celkové bilance uhlíku v rostlinách.

Je založena na stanovení výměny CO₂ a vodní páry mezi asimilačním aparátem rostlin a okolní atmosférou. Principem této metody je absorpce CO₂ a vodní páry v infračervené oblasti. Příjem resp. výdej CO₂ asimilujícím pletivem se projeví změnou koncentrace CO₂ v atmosféře obklopující měřený objekt. Změna koncentrace CO₂ je měřena pomocí infračerveného analyzátoru (IRGA). Aby bylo možné stanovit tuto změnu, je nutné umístit asimilující objekt do tzv. asimilační komory neboli listové kyvety. Tato je vzduchotěsně a elektronicky spojena s IRGA [8].

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1. Materiál

Měření aktivity enzymu Rubisco v podmínkách normální a zvýšené koncentrace CO_2 bylo prováděno u buku lesního (*Fagus sylvatica*). Stromy byly kultivovány v minisférách na Experimentálním ekologickém pracovišti Ústavu systémové biologie a ekologie AV ČR na Bílém Kříži v Moravskoslezských Beskydech (obr. 3.1.). V první minisféře je atmosféra s normální koncentrací CO_2 , což je asi $380 \mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$, je označována A - ambient. V druhé minisféře je atmosféra se zvýšenou koncentrací CO_2 , což je $700 \mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$, je označována E - elevated.

Vzorky listů ke stanovení aktivity byly odebrány dne 22. 7. 2009, v časech 4:00 - 5:00, 5:00 - 6:25, 6:35, 8:00 - 8:45, 10:00 - 10:45, 12:00 - 12:45, 14:00 - 14:35, 16:00 - 16:45, 18:00 - 18:40, 19:30, 21:30 (za tmy). Při každém odběru bylo odebráno 5 vzorků ($n = 5$) z atmosféry s běžnou koncentrací CO_2 (minisféra A) a 5 vzorků z minisféry se zvýšenou koncentrací CO_2 (minisféra E).

Odběr vzorků listů byl proveden odstřížením listu z větvičky. Pro stanovení byly použity jen zdravé listy. Z listu byl vyříznut disk o ploše 314 cm^2 . Dva tyto disky byly zváženy, vloženy do mikrozkuhavky Eppendorf a ponořeny do termosky s tekutým dusíkem. Vzorky byly při převozu uchovávány v termosce s tekutým dusíkem a poté až do samotné analýzy uchovávány v mrazničce při teplotě -70°C .



Obr. 3.1 Kultivační minisféry Experimentálního ekologického pracoviště ÚSBE AV ČR na Bílém Kříži. Vlevo minisféra s normální koncentrací, vpravo minisféra se zvýšenou koncentrací CO_2 . Převzato z [16].

3.2. Spektroskopické stanovení počáteční a celkové aktivity Rubisco

Stanovení aktivity enzymu Rubisco vycházelo z metody Lilleyho a Walkera [38] s extrakcí podle Besforda [40]. Tento postup pro stanovení aktivity Rubisco je založen na spřažení tří reakcí Calvinova cyklu (reakce III - V). Metoda byla modifikována pro stanovení počáteční aktivity podle Heringové [39]. Jako substrát byl použit ribosa-5-fosfát, který se transformuje pomocí enzymů obsaženými v extraktu na ribulosa-1,5-bisfosfát (reakce I a II). Výhodou použití ribosa-5-fosfátu je jeho nižší cena a stabilnější rychlost reakce, protože se substrát uvolňuje ze směsi postupně. Dále byl do směsi přidáván KHCO_3 , který uvolňuje CO_2 a aktivuje enzym Rubisco. K aktivaci Rubisco jsou důležité i ionty Mg^{2+} ve formě MgCl_2 . Do reakční směsi byly rovněž přidány enzymy, které katalyzují reakce (III) - (V), NADH a ATP. Konečným produktem reakce je glycerinaldehyd-3-fosfát (reakce III - V). Aby se zabránilo hromadění ADP, který inhibuje enzym fosfoglycerátkinasu, je ADP fosforylováno v reakci (VI). Aktivita Rubisco byla vypočítána podle Lambertova-Beerova zákona z úbytku absorbance při oxidaci NADH (reakce V).

- ribosa-5-fosfát $\xrightarrow{\text{ribosa-5-fosfátisomerasa}}$ ribulosa-5-fosfát (I.)
- ribulosa-5-fosfát + ATP $\xrightarrow{\text{ribulosa-5-fosfátkinasa}}$ ribulosa-1,5-bisfosfát + ADP + H^+ (II.)
- ribulosa-1,5-bisfosfát + CO_2 + H_2O $\xrightarrow{\text{Rubisco}}$ 2(3-fosfoglycerát) + 2H^+ (III.)
- 3-fosfoglycerát + ATP $\xrightarrow{\text{fosfoglycerátkinasa}}$ 1,3-bisfosfoglycerát + ADP (IV.)
- 1,3-bisfosfoglycerát + NADH + H^+ $\xrightarrow{\text{glycerinaldehyd-3-fosfátdehydrogenasa}}$ glycerinaldehyd-3-fosfát + NAD^+ + HPO_4 (V.)
- 2-fosfokreatin + 2 ADP $\xrightarrow{\text{kreatinfosfokinasa}}$ 2-kreatin + 2 ATP (VI.)

3.2.1. Přístroje

- Analytické váhy HR-120-EC od firmy HELAGO[®] CZ Hradec Králové.
Parametry: kapacita 120 g, nejmenší dílek 0,1 g, atest ČMI.
- pH metr KNICK Portamess, typ 913pH
- Centrifuga MLW T52.1
- Absorpční spektrofotometr Helios γ od firmy Spectronic Unicam. Měřicí rozsah 190 - 1100 nm, spektrální šířka pásu 2 nm.

3.2.2. Chemikálie

HEPES - N-2-hydroxyethylpiperazin-N'-ethansulfonová kyselina; Sigma ALDRICH
 Na_2EDTA - ethylendiamintetraoctan disodný; Sigma ALDRICH
KOH - hydroxid draselný; Penta
DTT - dithiotreitol; Sigma ALDRICH
 MgCl_2 - chlorid hořečnatý; Sigma ALDRICH
BSA - bovinní sérový albumin; Sigma ALDRICH
 KHCO_3 - hydrogenuhličitan draselný; Sigma ALDRICH
Glycerinaldehyd-3-fosfátdehydrogenasa; Sigma ALDRICH
Kreatinfosfokinasa; Sigma ALDRICH
R-5-P - ribosa-5-fosfát; Sigma ALDRICH
Kreatinfosfokinasa; Sigma ALDRICH
ATP - adenosin-5'-trifosfát; Sigma ALDRICH
NADH - β -nikotinamidadenindinukleotid; Sigma ALDRICH
Fosfokreatin; Sigma ALDRICH

3.2.3. Příprava roztoků

3.2.3.1. *Příprava zásobního roztoku 50 mM HEPES-KOH, pH 7,8*

V asi 800 ml vody bylo rozpuštěno 11,92 g HEPES a 0,372 g Na₂EDTA. Po rozpouštění bylo upraveno pH pomocí KOH ($c = 3 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) na 7,8. Poté byl roztok převeden do odměrné baňky na 1000 ml a vodou doplněn po rysku.

Roztok je stálý a uchovává se při laboratorní teplotě. Používá se pro přípravu extrakčního roztoku.

3.2.3.2. *Příprava zásobního roztoku 50 mM HEPES-KOH, pH 8,0*

V asi 800 ml vody bylo rozpuštěno 11,92 g HEPES a 0,438 g Na₂EDTA. Po rozpouštění bylo uvedeno pH pomocí KOH ($c = 3 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) na 8,0. Poté byl roztok převeden do odměrné baňky na 1000 ml a vodou doplněn po rysku.

Roztok je stálý a uchovává se při laboratorní teplotě. Používá se pro přípravu pracovního a aktivačních roztoků.

3.2.3.3. *Příprava aktivačních roztoků*

V odměrné baňce na 50 ml bylo rozpuštěno 0,2285 g MgCl₂ v HEPES-KOH, pH 8,0.
v odměrné baňce na 50 ml bylo rozpuštěno 0,3003 g KHCO₃ v HEPES-KOH, pH 8,0.

Roztoky jsou stálé a uchovávají se při laboratorní teplotě. Z těchto roztoků se pipetuje po 50 μl do optické kyvety, což odpovídá konečné koncentraci 20 mM MgCl₂ a 25 mM KHCO₃ v aktivačním roztoku.

3.2.3.4. *Příprava extrakčního roztoku*

V odměrné baňce na 200 ml bylo rozpuštěno 0,156 g DTT, 0,096 g MgCl₂ a 0,4 g BSA v zásobním roztoku HEPES-KOH, pH 7,8.

Roztok se uchovává při teplotě 4 °C. Takto připravený roztok obsahuje 50 mM HEPES-KOH, pH 7,8, 1 mM Na₂EDTA, 5 mM DTT, 5 mM MgCl₂ a 0,2 % BSA.

3.2.3.5. *Příprava roztoku glycerinaldehyd-3-fosfátdehydrogenasy*

V 1 ml zásobního roztoku HEPES-KOH, pH 8,0 bylo rozpuštěno 6 mg enzymu. Roztok se uchovává při teplotě -18 °C.

3.2.3.6. *Příprava roztoku kreatinfosfokinasy*

V 1 ml zásobního roztoku HEPES-KOH, pH 8,0 byly rozpuštěny 2 mg enzymu. Roztok se uchovává při teplotě -18 °C.

3.2.3.7. *Příprava roztoku R5P*

V 1 ml zásobního roztoku HEPES-KOH, pH 8,0 bylo rozpuštěno 6,2 mg R5P. Roztok se uchovává při teplotě -18 °C.

3.2.3.8. *Příprava roztoku 3-fosfoglycerátkinasy*

Ke stanovení byl použit komerčně dodávaný roztok. Roztok se uchovává při teplotě 4 °C.

3.2.3.9. *Příprava pracovního roztoku*

V odměrné baňce na 10 ml bylo rozpuštěno v zásobním roztoku HEPES-KOH, pH 8,0:

0,002 g NADH

0,008 g DTT

0,013 g fosfokreatinu

0,019 g ATP

19 µl 3-fosfoglycerátkinasy

100 µl roztoku kreatinfosfokinasy

100 µl roztoku glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenasy

Takto připravený pracovní roztok obsahuje 50 mM HEPES-KOH, pH 8,0, 1 mM Na₂EDTA, 0,25 mM NADH, 5 mM DTT, 5 mM fosfokreatinu, 3,5 mM ATP, 80 nkat 3-fosfoglycerátkinasy, 80 nkat kreatinfosfokinasy a 80 nkat glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenasy. Pracovní roztok je stálý maximálně 6 hodin a uchovává se při laboratorní teplotě.

3.2.4. **Extrakce enzymu**

Vzorek listu, přibližně 60 mg, byl rozdrcen v třecí misce spolu s mořským pískem. Následně bylo přidáno 5 ml extrakčního roztoku a směs byla asi 30 sekund homogenizována. Výsledná suspenze byla přelita do centrifugační zkumavky a 30 sekund odstředována. Získaný extrakt byl použit ke stanovení počáteční a celkové aktivity. Tento extrakt rychle stárne, a proto bylo nutné ho zpracovávat co nejrychleji.

3.2.5. **Měření aktivity**

3.2.5.1. *Počáteční aktivita*

Pro měření počáteční aktivity bylo do optické kyvety napipetováno 50 µl aktivačního roztoku MgCl₂ a 50 µl aktivačního roztoku KHCO₃. Dále bylo připraveno 20 µl extraktu, 850 µl pracovního roztoku a 30 µl roztoku R5P. Po promíchání byl ihned měřen pokles absorbance v 30s intervalech při vlnové délce 340 nm.

3.2.5.2. *Celková aktivita*

Pro měření počáteční aktivity bylo do optické kyvety napipetováno 50 µl aktivačního roztoku MgCl₂ a 50 µl aktivačního roztoku KHCO₃ a 20 µl extraktu. Roztok byl promíchán a 15 minut inkubován při laboratorní teplotě. Po inkubaci bylo do kyvety přidáno 850 µl pracovního roztoku a 30 µl roztoku R5P. Po promíchání byl měřen pokles absorbance v 30 s intervalech při vlnové délce 340 nm.

3.2.6. **Výpočet aktivity enzymu Rubisco**

Měření absorbance bylo provedeno u jedenácti vzorků, odebíraných v atmosféře s běžným a zvýšeným obsahem CO₂ v různých časech. Každý vzorek byl měřen v 30 s intervalech a bylo tak získáno celkem 12 hodnot absorbancí pro každý ze vzorků. Z těchto hodnot byl vypočten úbytek absorbance za 30 sekund ΔA . Po vyřazení odlehlých hodnot byla ze změn absorbance vypočtena aktivita enzymu Rubisco z Lambertova - Beerova zákona:

$$\frac{\Delta A}{\Delta t} = \varepsilon \cdot l \cdot \frac{\Delta c}{\Delta t}$$

kde ΔA je změna absorbance, t je čas [s], l je délka optické dráhy [cm], ε je molární absorpční koeficient [$\text{cm}^2 \cdot \text{mmol}^{-1}$], c je koncentrace [$\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$].

Tabulka 1: Měření počáteční aktivity ve vzorku 8 při standardní koncentraci CO_2 . ΔA je změna absorbance za 30 s.

Uh aA_8	plocha (m^2)	čerstvá hmot.(g)	ΔA
1	0,000628	0,099	0,001*
2	0,000628	0,099	0,002
3	0,000628	0,099	0,003
4	0,000628	0,099	0,002
5	0,000628	0,099	0,002
6	0,000628	0,099	0,002
7	0,000628	0,099	0,003
8	0,000628	0,099	0,002
9	0,000628	0,099	0,002
10	0,000628	0,099	0,004*
11	0,000628	0,099	0,002
12	0,000628	0,099	
		průměr ΔA	0,0022
aktivita ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}$)		2,3403	

* značí statisticky odlehlou hodnotu, která nebyla zahrnuta do výpočtů

Aktivita enzymu byla vypočtena z rychlosti úbytku látkového množství substrátu (CO_2):

$$\Delta n = \frac{2 \cdot \Delta A \cdot V}{2 \cdot \varepsilon \cdot l}$$

kde ΔA je průměrný úbytek absorbance [min^{-1}], V je objem vzorku [μl], ε je molární absorpční koeficient [$\text{cm}^2 \cdot \text{mmol}^{-1}$], a l je délka optické dráhy [cm]. Hodnota ε je pro NADH $6300 \text{ cm}^2 \cdot \text{mmol}^{-1}$ a délka optické kyvety je 1 cm.

Aktivita v 1000 μl extraktu:

$$\Delta n = \frac{\Delta A \cdot V}{2 \cdot \epsilon \cdot l} = \frac{0,0044 \cdot 1000}{2 \cdot 6300 \cdot 60} = 5,82 \cdot 10^{-6} \mu\text{mol CO}_2 \text{s}^{-1}$$

Aktivita v 5 ml extraktu:

$$\Delta n = \frac{5 \cdot 5,82 \cdot 10^{-6}}{0,02} = 0,001455 \mu\text{mol CO}_2 \text{s}^{-1}$$

Aktivita enzymu vztažená na jednotkovou plochu listu:

$$\Delta n = \frac{0,001455}{0,000628} = 2,319 \mu\text{mol CO}_2 \text{s}^{-1} \text{m}^{-2}$$

4 VÝSLEDKY A DISKUSE

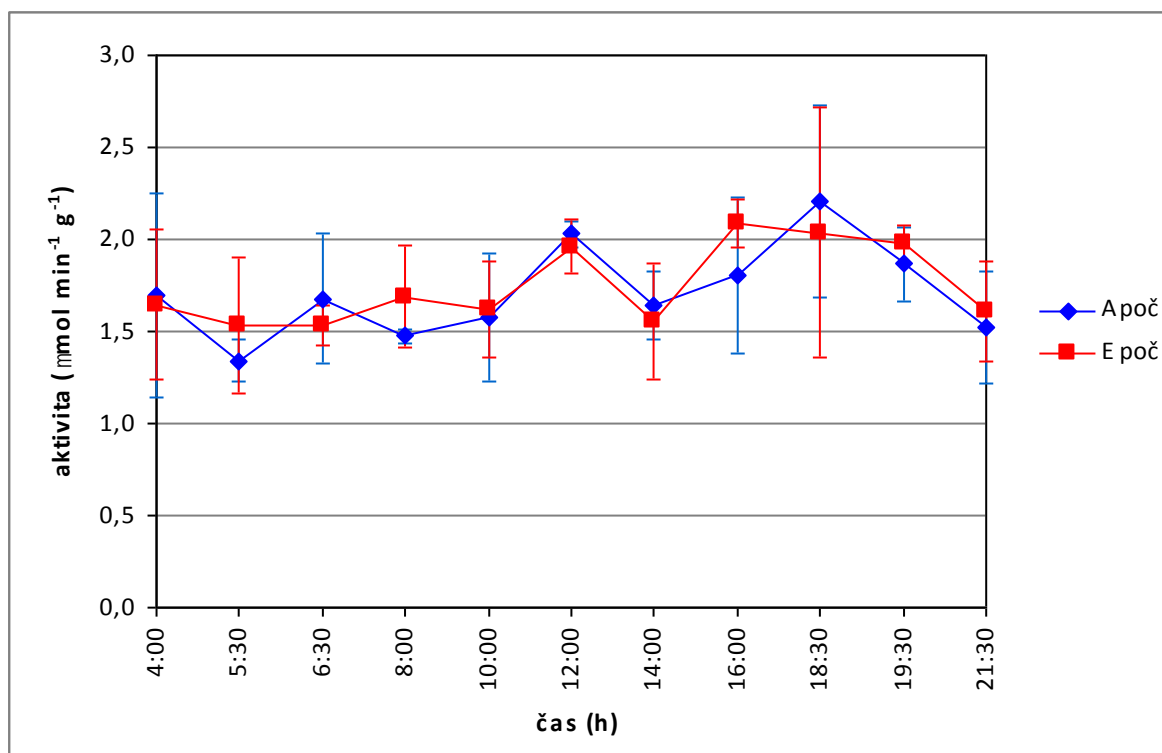
4.1. Výsledky

Tabulka 2. Hodnoty počáteční a celkové aktivity pro běžnou koncentraci CO₂.

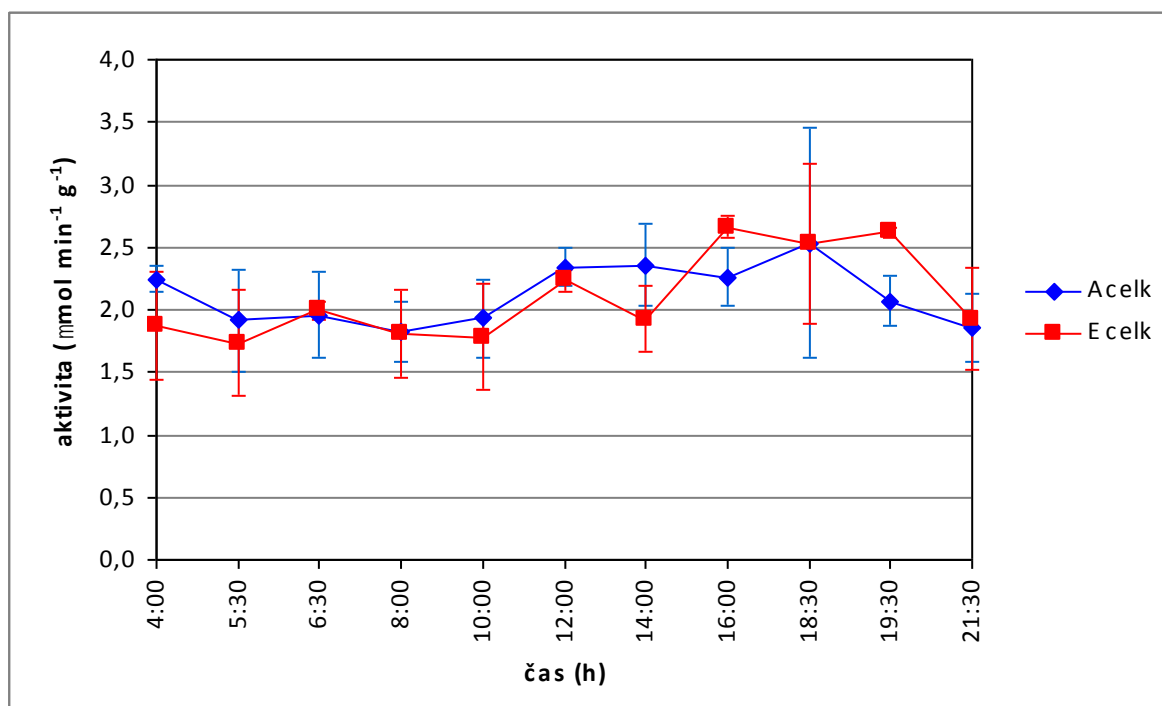
Čas odběru vzorku (h)	Počáteční aktivita ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}$)	Celková aktivita ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}$)
4:00	1,69	2,09
5:30	1,70	1,97
6:30	1,47	1,77
8:00	1,65	1,83
10:00	1,70	1,93
12:00	1,84	2,14
14:00	1,73	2,36
16:00	1,83	2,31
18:30	2,39	2,75
19:30	1,87	2,29
21:30	1,52	1,86

Tabulka 3. Hodnoty počáteční a celkové aktivity pro zvýšenou koncentraci CO₂.

Čas odběru vzorku (h)	Počáteční aktivita ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}$)	Celková aktivita ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}$)
4:00	1,65	1,87
5:30	1,54	1,74
6:30	1,49	1,83
8:00	1,60	1,81
10:00	1,56	1,78
12:00	1,85	2,23
14:00	1,56	1,94
16:00	1,61	2,26
18:30	2,04	2,29
19:30	1,81	2,45
21:30	1,44	1,93



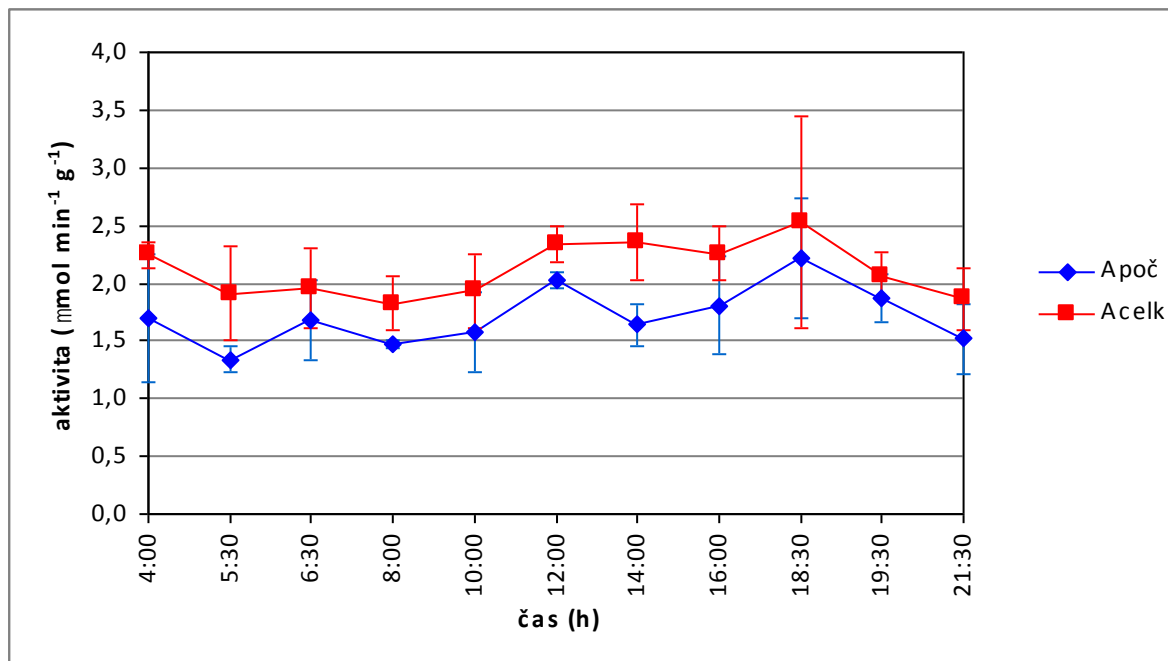
Obr. 4.1 Počáteční aktivita u normální a zvýšené koncentrace CO₂.



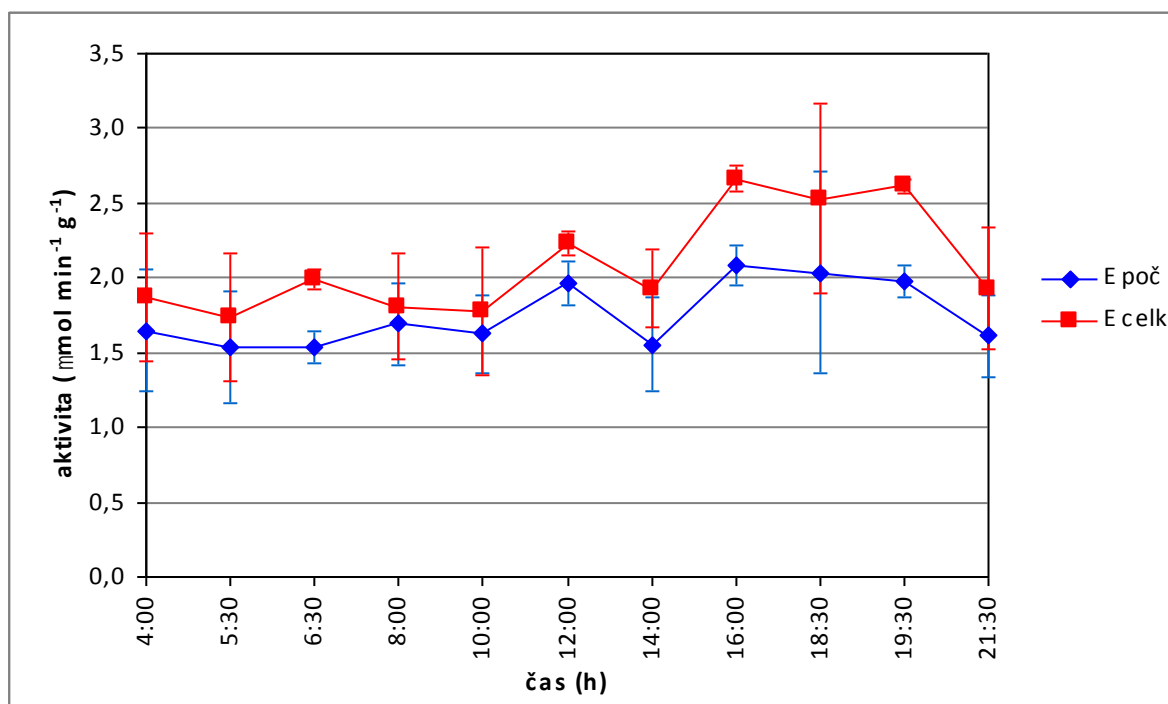
Obr. 4.2 Celková aktivita u normální a zvýšené koncentrace CO₂.

Z obrázku 4.1 a 4.2 je zřejmé, že počáteční i celková aktivita enzymu Rubisco při zvýšené koncentraci (E) nebyla statisticky významně odlišná od aktivity Rubisco při normální koncentraci (A). V průběhu dne vykazovala aktivita jenom statisticky nevýznamné odchylky

a ani po rozednění nenastal vzestup celkové aktivity Rubisco, což svědčí o nepřítomnosti nebo zanedbatelné roli nočního inhibitoru CA1P.

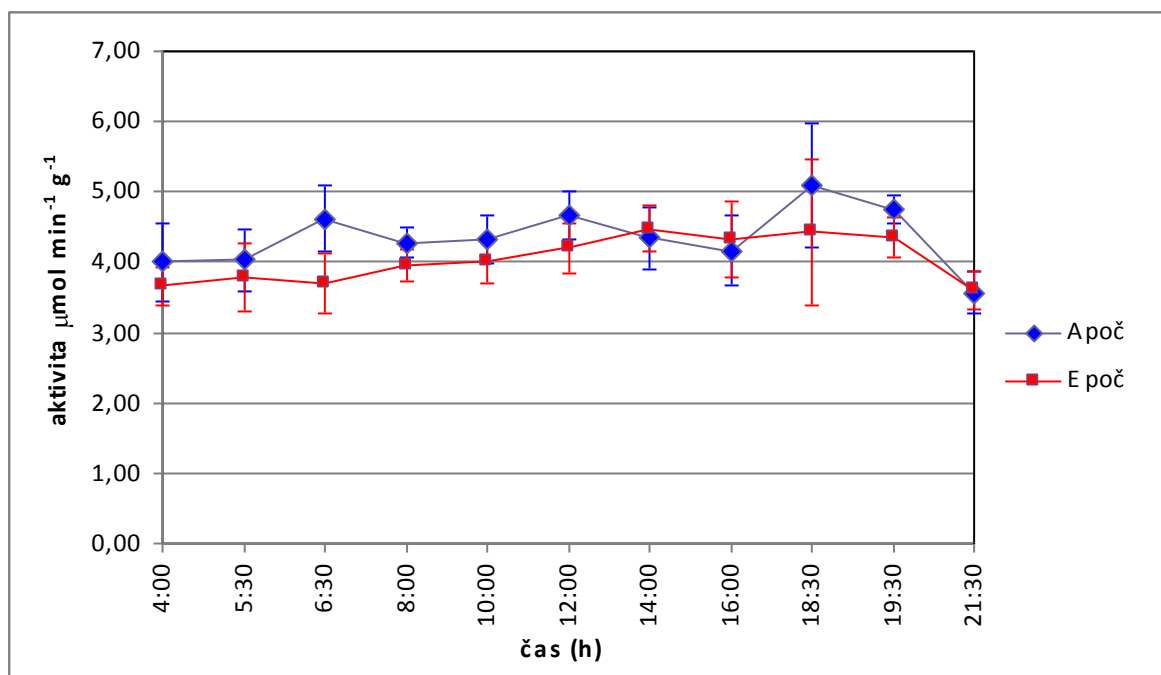


Obr. 4.3 Počáteční a celková aktivita pro normální koncentraci CO₂.



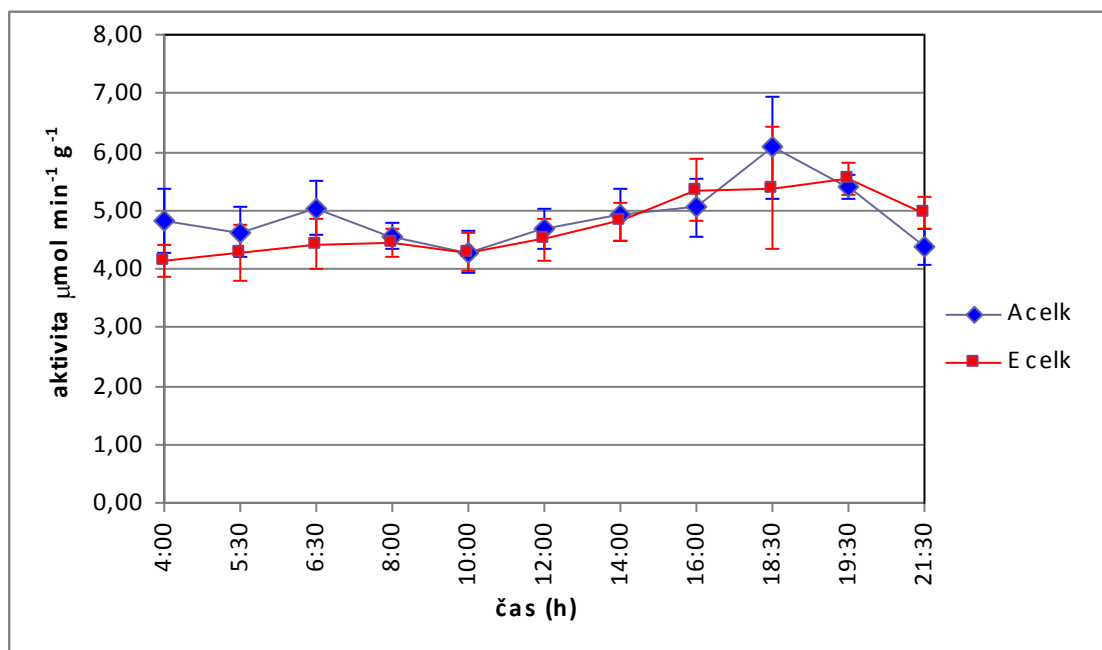
Obr. 4.4 Počáteční a celková aktivita pro zvýšenou koncentraci CO₂.

Z obr. 4.3 a 4.4 je zřejmé, že celková aktivita kopírovala průběh počáteční aktivity. V průběhu dne tedy nedošlo k velkým změnám v karbamylaci enzymu Rubisco. Grafy aktivit vztažené na jednotku plochy listu



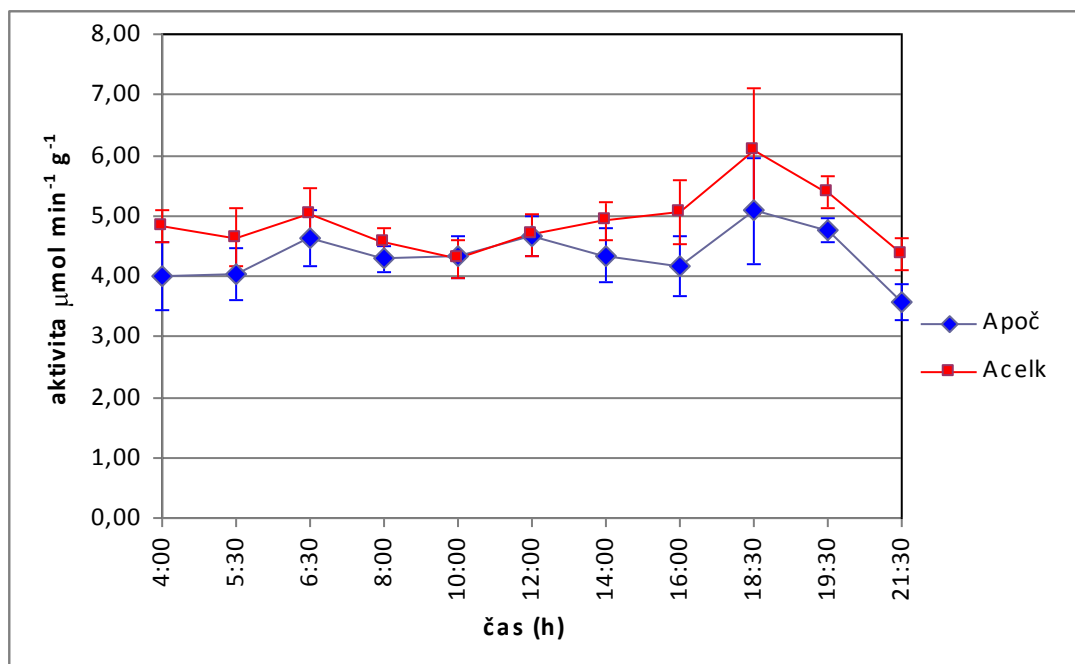
Obr. 4.5. Počáteční aktivita pro normální a zvýšenou koncentraci CO_2 v čase vztažená na jednotku plochy listu.

Z obr. 4.5 je vidět že počáteční aktivita u normální koncentrace je statisticky odlišná od zvýšené koncentrace pouze v 6:30 ráno. V ostatních časech nebyly hodnoty aktivit statisticky odlišné.

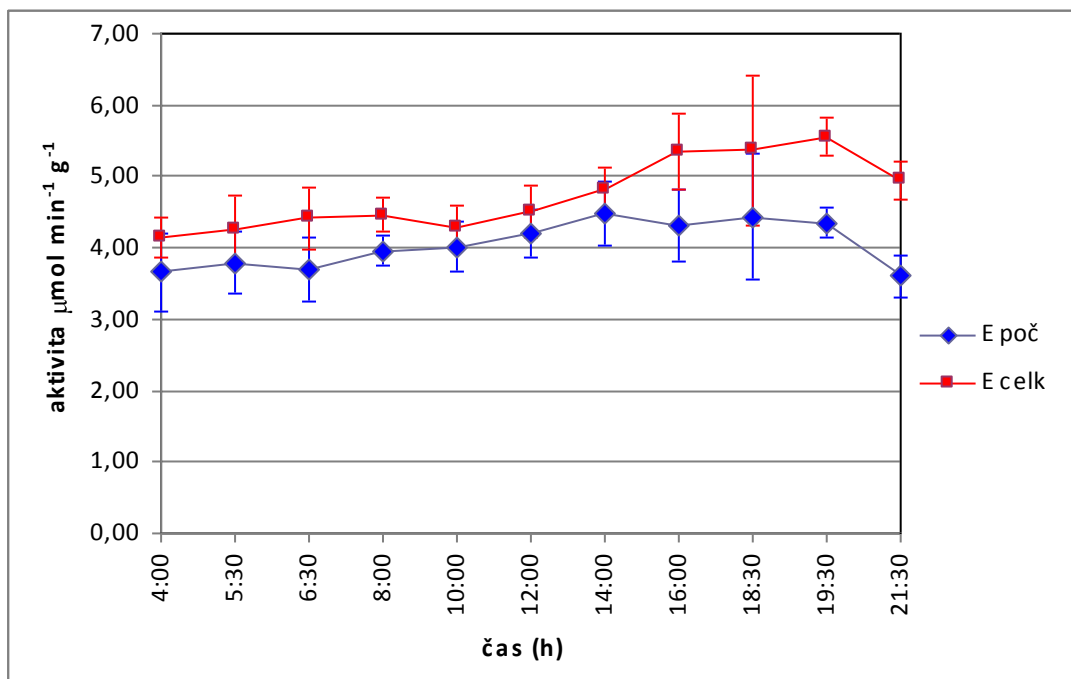


Obr. 4.6 Celková aktivita pro normální a zvýšenou koncentraci CO_2 .

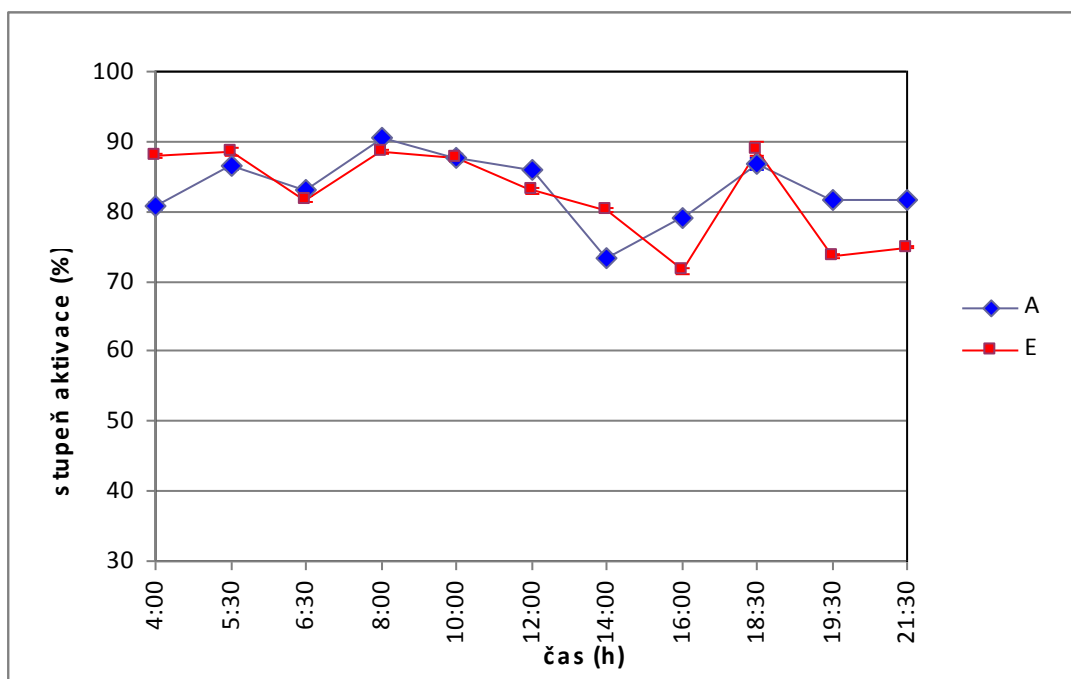
Z obr. 4.6 je zřejmé, že nebyly zjištěny statisticky významné odlišnosti mezi celkovou aktivitou u normální a zvýšené koncentrace CO_2 .



Obr. 4.7. Počáteční a celková aktivita pro normální koncentraci CO_2 vztažená na jednotku plochy listu.



Obr. 4.8 Počáteční a celková aktivita pro zvýšenou koncentraci CO_2 vztažená na jednotku plochy listu.



Obr. 4.9 Stupeň aktivace pro normální (A) a zvýšenou koncentraci (E) během dne.

Z obr. 4.9 je vidět, že stupeň aktivace byl brzy ráno (ve 4:00) vyšší u rostlin se zvýšenou koncentrací CO_2 . Během dne byla aktivace přibližně srovnatelná a od 10:00 je možné pozorovat pokles stupně aktivace tzv. polední depresi, která u rostlin s normální koncentrací CO_2 trvala do 14:00 a u rostlin se zvýšenou koncentrací CO_2 do 16:00. Při setmění (ve 21:30) byla aktivace vyšší u rostlin s normální koncentrací CO_2 . Nejvyšší stupeň aktivace byl pozorován v 8:00 ráno a v 18:30 večer.

4.2. Diskuse

Aktivita Rubisco je velmi proměnlivá veličina, která závisí na mnoha faktorech např. výživě rostliny, fyziologickém stavu rostliny, osvětlení, množství aktivních míst a obsazenosti těchto míst apod.

Jing a Xu [25] uvádějí, že denní chod aktivity Rubisco u rýže vykazuje minimální hodnoty v 6:00 a 18:00 a maximální hodnoty v době 8:00–12:00, přičemž maximální hodnoty jsou přibližně trojnásobkem hodnot minimálních.

Sihha et al. [28] pozorovali u *Prosopis juliflora*, že denní chod aktivity Rubisco tvoří křivku se dvěma maximy (v 10 a 15 hod) a minimem ve 12:00 (polední deprese).

Podle Peréze et al. [41] vykazují listy pšenice malé změny v denním chodu aktivity. U počáteční aktivity byl nepatrný nárůst aktivity pozorován od 6:00 do 12:00 hodin a poté následovalo prudší snížení aktivity do 20:00. U celkové aktivity došlo k pozvolnějšímu poklesu od 12:00 do 20:00.

Z článku dle Wang et al. [26] je možné u rýže pozorovat typickou křivku se dvěma maximy. První maximum se zdá být kolem 8:00 a druhé ve 14:00 hodin a polední deprese vykazuje snížení aktivity enzymu Rubisco zhruba ve 13:00 zhruba na polovinu aktivity v 8:00.

U divoce rostoucí sóji bylo dle Servaitese et al. [27] zjištěno, že počáteční aktivita roste od 6:00 s rostoucím ozářením a klesá, když je slunečního záření méně. Aktivita enzymu Rubisco stoupala asi do 10:00 a poté byla konstantní přibližně do 16:00. Nebyla pozorována polední deprese doprovázená snížením aktivity.

Dle Hrstky et al [33] z 19. října 2005 bylo u smrku ztepilého (*Picea abies*) zjištěno, že počáteční aktivita v 6:00 byla extrémně nízká a maximální hodnoty aktivity byly dosaženy v 11:00 a 17:00 a minimum (polední deprese) nastalo ve 13:00.

V našem experimentu nebyly pozorovány statisticky významné rozdíly v aktivitě Rubisco mezi buky kultivovanými v normální a zvýšené koncentraci CO₂.

U počátečních aktivit je možné pozorovat denní minimum v 5:30 a maximum ve 12:00 a 18:30. Mírná polední deprese se objevuje od 12:00 do 14:00 hodin. Celková aktivita nevykazuje žádná zřetelná maxima ani minima. Od 4:00 došlo k mírnému snížení celkové aktivity enzymu, což by mohlo znamenat nepřítomnost CA1P.

Stupeň aktivace má odlišný průběh u varianty A a E. U varianty A následovalo po rozednění zvýšení stupně aktivace z 81 % na 86 %. U varianty E byl stupeň aktivace před rozedněním vyšší 88 % než u varianty A, ale po rozednění se nezvyšoval. Maximální stupeň aktivace byl naměřen u obou variant v 8:00 (asi 90 %) a v 18:30 (asi 87 %). Polední deprese se u normální koncentrace CO₂ objevila ve 14:00 a to snížením stupně aktivace asi na 72 % a u zvýšené koncentrace CO₂ taktéž na 71-72 %, ale pokles nastal zhruba o 2 hodiny později. Příčinou polední deprese by mohla být omezená schopnost thylakoidů zpracovávat vyšší světelné toky. Zvyšujeme-li ozářenost thylakoidu, stoupá v něm okamžitá koncentrace excitací, ale současně klesá počet otevřených reakčních center, v nichž může být excitace účinně přeměněna. Proto se s rostoucí ozářeností snižuje účinnost přeměny pohlceného záření (snižuje se podíl pohlcených fotonů, jejichž energie se zachová v podobě rozdělených nábojů a zvětšuje se podíl těch, jejichž energie se přemění na teplo nebo ve fluorescenci) [3].

5 ZÁVĚR

V předložené práci byl sledován vliv zvýšené koncentrace CO_2 na denní chod aktivity enzymu Rubisco u buku lesního (*Fagus sylvatica*). Stromky buku byly kultivovány jednak při normální ($380 \mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$) koncentraci CO_2 a při zvýšené ($700 \mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$) koncentraci CO_2 . Vzorky listů byly odebírány 22. 7. 2009 zhruba ve dvouhodinových intervalech, aktivita Rubisco byla stanovena spektrofotometricky.

Zvýšená koncentrace CO_2 neměla statisticky významný vliv na počáteční ani celkovou aktivitu Rubisco, nebyla tedy prokázána aklimační deprese na úrovni aktivity tohoto enzymu. V průběhu dne vykazovala aktivita jenom statisticky nevýznamné odchylky a ani po rozednění nenastal vzestup celkové aktivity Rubisco, což svědčí o nepřítomnosti nebo zanedbatelné roli nočního inhibitoru CA1P. Celková aktivita kopírovala průběh počáteční aktivity. Mírný pokles stupně aktivace v odpoledních hodinách indikoval mírnou odpolední depresi počáteční aktivity enzymu Rubisco.

6 POUŽITÁ LITERATURA:

- [1] VODRÁŽKA, Z. *Biochemie*. 2. opravené vyd. (dotisk). Praha : Academia, 1999. 191 s. ISBN 80-200-0600-1.
- [2] NÁTR, L. *Koncentrace CO₂ a rostliny*. první. Praha : ISV, 2000. 257 s. ISBN 80-85866-62-5.
- [3] FLORIÁN, J. *Krátkodobé a střednědobé změny aktivity a množství ribulosa-1,5-bisfosfátkarboxylasy/oxygenasy u Beta vulgaris a jejich vliv na rychlos fotosyntézy*. Brno, 2006. 47 s. Diplomová práce. VUT.
- [4] LEEGOOD, R. C.; SHARKEY, T. D.; VON CAEMMERER, S. *Photosynthesis: Physiology and Metabolism*. Dordrecht : Kluwer Academic Publishers, 2000. 113 s. ISBN 0-7923-6143-1.
- [5] VIČÍKOVÁ, M. *Vliv zvýšené koncentrace oxidu uhličitého na aktivitu a obsah enzymu Rubisco ve slunných a stinných listech buku lesního*. Brno, 2009. 48 s. Bakalářská práce VUT.
- [6] Struktura enzymu Rubisco. Dostupné z: <http://biomikro.vscht.cz/enzymologie/rubisco.pdf>
- [7] Průřez chloroplastem. Dostupné z : www.michaelsharris.com/.../photosynthesis2.htm
- [8] DRAKE, B.G., GONZALES-MELER, M.A., LONG, S.P.: More efficient plants : A consequence of rising atmospheric CO₂?. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 1997, 48, s. 609-639.
- [9] GONZÁLES-MELER, M.A., RIBAS-CARBÓ, M. SIEDOW, J.N., DRAKE B.G.: Direct inhibition of plant mitochondrial respiration by elevated CO₂. *Plant Physiol.* 1996, 112, s. 1349-1355.
- [10] THEOBALD, J. C., MITCHELL, R.A.C., PARRY, M.A.J., LAWLOR D.W.: Estimating the excess investment in ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase in leaves of spring wheat grown under elevated CO₂. *Plant Physiol.* 1998, 118, s. 945-955.
- [11] POORTER, H.: Interspecific variation in the growth response of plants to an elevated ambient CO₂ concentration. *Vegetatio*. 1993, 104/105, s. 77-97.
- [12] ACOCK, B. ACOCK, M.C. PASTERNAK, D.: Interactions of CO₂ enrichment and temperature on carbohydrate production and accumulation in muskmelon leaves. *J.Amer.Soc.Hort.Sci.* 1990, 115, s. 525-529.
- [13] MORISON, J.I.L., LAWLOR, D.W.: Interactions between in creasing CO₂ concentration and temperature on plant growth. *Plant, Cell environment*. 1999, 22.
- [14] MAREK, M.V., ŠPRTOVÁ, M., KALINA, J. The photosynthetic irradiance-response of Norway spruce exposed to along-term elevation of CO₂ concentration. *Photosynthetica*. 1997, 33, s. 259-268.
- [15] GRIFFIN, K.L., SEEMANN, J.R.: Plants, CO₂ and photosynthesis in the 21st. century. *Chemistry Biol.* 1996, 3, s. 245-254.
- [16] Lamelové kultivační sféry – EEP Bílý Kříž simulují účinek zvýšené koncentrace CO₂ na úrovni porostu. Dostupné z : <http://www.usbe.cas.cz/czechcarbo/vyzkum.htm>

- [17] TROWN, P.W.: An important method for the isolation of carboxydismutase. *Biochemistry*. 1965, 4, s. 908-918.
- [18] KAWASHIMA, N.: Non-synchronous incorporation of $C^{14}O_2$ into amino acids of the two subunits of fraction I protein, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1970, 38, Issue 1, s. 119-1
- [19] NEČESANÁ, Petra. *Dlouhodobý účinek zvýšené koncentrace oxidu uhličitého na aktivitu enzymu Rubisco u smrku ztepilého*. 55 s. Diplomová práce VUT, Brno 2002
- [20] PEÑUELAS, J., MATAMALA, R. Changes in N and S leaf content, stomatal density and specific leaf area of 14 plant species during the last three centuries of CO_2 increase. *J. Exp. Bot.* 1990, 41, s. 1119-1124.
- [21] HRSTKA, M. *Dlouhodobý účinek zvýšené koncentrace oxidu uhličitého na aktivitu ribulosa-1,5-bisfosfátcarboxylasy/oxygenasy u smrku ztepilého*. Brno, 2004. 77 s. Dizertační práce. VUT.
- [22] MATULKOVÁ, Z. *Vliv stárnutí listů na obsah enzymu Rubisco*. Brno, 2008. 42 s. Bakalářská práce. VUT.
- [23] HARTMAN, F.C; HARPEL, M.R. Structure, function, regulation, and assembly of D- ribulose- 1,5-bisphosphatecarboxylase/oxygenase. *Annu. Rev. Biochem.* 1994, 63, s. 197-234.
- [24] PETRŮ, E. *Závislost aktivity a množství enzymu Rubisco na ozáření*. Brno, 2005. Diplomová práce. VUT.
- [25] JIANG, De-An; XU, Yia-Fa. Diurnal changes of Photosynthetic rate, stomatal conductance and Rubisco in rice leaf. *Acta Phytophysiologica Sinica*. 1996, 1, 22, s. 94-100.
- [26] WANG, Ni-Yan., JIANG, De-An., HONG, J., ZHANG, F., WENG, Xiao-Yan.: Diurnal changes of Rubisco and RCA Activities and their cellular localization in rice. *Acta Botanica Sinica*. 2003, 9, 45, s. 1076-1083.
- [27] SERVAITES, J.C.; TORISKY, R.S.; CHAO, S.F. Diurnal changes in ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase activity and activation state in leaves of field-grown soybeans. *Plant Science Letters*. 1984, 35, s. 115-121.
- [28] SINHA, A.K., SHIRKE, P.A., PARHRE, P.V.SANE.: U. Midday depression photosynthesis: Effect on sucrose-phosphate synthase and ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase in leaves of *Prosopis juliflora* (Swartz)DC. *Photosynthetica*. 1997, 34, 1, s. 115-124.
- [29] *Struktura Rubisco - vlevo forma II (L_2), vpravo forma I (L_8S_8)*. Dostupné z: <http://biomikro.vscht.cz/enzymologie/rubisco.pdf>
- [30] SAXE, H., ELLSWORTH, D.S., HEATH, J. Tree and forest functioning in an enriched CO_2 atmosphere. *New Phytol.* 1998, 139, s. 395-436.
- [31] EAMUS, D. Ecophysiological traits of deciduous and evergreen woody species in the seasonally dry tropics. *Tree* . 1999, 14, s. 11-16.
- [32] NI-YAN, W., DE-AN, J., JIAN, H., FENK, Z., XIAO-YAN, W.: Diurnal changes and RCA activities and their cellular localization in rice. *Acta Botanica Sinica*. 2003, 45, s. 1076-1083.
- [33] HRSTKA, M.; URBAN, O.; PETRŮ, E. Diurnal regulation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activity and its content in Norway spruce needles. *Photosynthetica*. 2007, 45, s. 334-339.

- [34] <http://www.osel.cz/popisek.php?popisek=1841&img=1139058922.jpg>
- [35] ZACHOVÁ, L. Účinek zvýšené koncentrace oxidu uhličitého na množství a aktivitu enzymu Rubisco. Brno, 2008. 48 s. Diplomová práce. VUT.
- [36] HARTMAN, F. C., HARPEL, M. R. Structure, function, regulation and assembly of D-ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. *Annu. Rev. Biochem.*, 1994, roč. 63, s. 197-234.
- [37] CEULEMANS, R.; MOUSSEAU, M. Effects of elevated atmospheric CO₂ on woody plants.. *New Phytol.* 1994, 127, s. 425-446.
- [38] LILLEY, R.M., WALKER, D.A. An improved spectrophotometric assay for ribulose carboxylase. *Biochem Biophys. Acta.* 1997, 358, s. 226-229.
- [39] HERINGOVÁ, P. Aktivita enzymu Rubisco u smrku ztepilého v průběhu dne. Brno, 2004. Diplomová práce. VUT.
- [40] BESFORD, R.T. Some properties of Ribulose bisphosphate carboxylase extracted from tomato leaves. *Journal of Experimental Botany.* 1984, 35, 153, s. 495-504.
- [41] ÉREZ, P.; MORCUENDE, R.; MOLINO, I.M. Diurnal changes of Rubisco in response to elevated CO₂ temperature and nitrogen in wheat grown under temperature gradient tunnels. *Environment and Experimental Botany.* 2005, 53, s. 13-27. Dostupný také z WWW: <www.elsevier.com/locate/envexbot>.

7 SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ

ADP	adenosindifosfát
ATP	adenosintrifosfát
BSA	bovinní sérový albumin
C	uhlík
CA1P	2-karboxyarabinitol-1-fosfát
CO ₂	oxid uhličitý
ČR	Česká republika
DTT	dithiotreitol
HCl	kyselina chlorovodíková
HEPES	N-2-hydroxyethylpiperazin-N'-ethanosulfonová kyselina
IRGA	infračervený analyzátor plynu
KDa	Kylodaltan
KOH	hydroxid draselný
MgCl ₂	chlorid manganatý
minisféra A	atmosféra se standardní koncentrací CO ₂
minisféra E	atmosféra se zvýšenou koncentrací CO ₂
Mn ²⁺	ion manganatý
N	dusík
Na ₂ EDTA	ethylendiamintetraoctan disodný
NADH	nikotinamidadenidinukleotid
NADPH	nikotinamidadenidinukleotidfosfát
R-5-P	ribosa-5-fosfát
BuBP	ribulosa-1,5-bisfosfát
Rubisco	ribulosa-1,5-bisfosfátkarboxylasa/oxygenia
ÚSBE	Ústav systémové biologie a ekologie